

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Sandra Žáčková

**INTERAKCE HLAVNÍHO KAPSIDOVÉHO PROTEINU POLYOMAVIRŮ S
JADERNÝMI LAMINY**

**MAJOR CAPSID PROTEIN OF POLYOMAVIRUSES AND ITS
INTERACTIONS WITH NUCLEAR LAMINS**

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Lenka Horníková, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 26. 4. 2021

.....
Podpis

Tato práce vznikla v letech 2018 – 2021 za finanční podpory Grantové agentury České republiky - grantu 19-14445S Jaderná fáze polyomavirové infekce: ustanovení infekce a virové restriční faktory.

Poděkování:

Tímto bych chtěla velice poděkovat své školitelce **RNDr. Lence Horníkové, Ph.D.** za vedení mé diplomové práce a za četná doporučení, rady a dobře cílené připomínky při jejím vypracování. Především bych však chtěla poděkovat za její pozitivní přístup, podporu, trpělivost a schopnost probudit v člověku touhu poznávat a nebát se občasného selhání, které stály na počátku mého rozhodnutí vydat se vstříc dalšímu studiu a bez nichž bych pravděpodobně toto rozhodnutí neudělala. Nic z toho by nebylo možné bez vstřícného přijetí do kolektivu laboratoře, za které děkuji vedoucí laboratoře **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** Speciální dík patří kolegům z laboratoře, jmenovitě **Mgr. Kateřině Bruštkové, Ph.D., Mgr. Martinu Fraiberkovi, Ph.D., Ivaně Polívkové a Mgr. Borisi Ryabchenkovi**, kteří mi mnohokrát vyšli vstříc nad rámec svých pracovních povinností a na úkor svého volného času. Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mne po celou dobu studia podporovali všemi myslitelnými způsoby a v krušných chvílích mi nedovolili zanevřít na mé sny.

Abstrakt

Tato práce se soustředí na studium interakcí virových strukturních proteinů myšího polyomaviru (MPyV) a BK viru se strukturou jaderné laminy. Cílem bylo objasnit, zda a případně jakým způsobem virus, potažmo virové strukturní proteiny, interagují s jadernou laminou a jak tyto interakce ovlivňují její vlastnosti. Předpokládali jsme, že exprese virových proteinů bude indukovat rozrušení struktury jaderné laminy, které následně umožní únik virionů z jádra v závěrečné fázi infekce. Strukturní proteiny MPyV byly exprimovány z expresního vektoru pMPyV LATE, který zajistil lokalizaci virového proteinu VP1 podobnou jako u infikovaných buněk – převážně v perinukleárních oblastech jádra. Zároveň v těchto buňkách byly nalezeny defekty v barvení jaderné laminy indikující její narušení tak, jak je tomu v buňkách infikovaných MPyV. Pro experimenty jsme používali ještě expresní vektor pMPyV mut3 VP1 kódující mutovaný protein VP1. Při transientní expresi v buňkách vykazoval mutovaný protein VP1 sice difúzní jadernou lokalizaci, ale pozorovali jsme výrazné deformace a poruchy barvení jaderné laminy, které naznačují významnou roli proteinu VP1 ve změnách vlastností jaderné laminy v infikovaných a transfekovaných buňkách. Zjistili jsme, že největší množství proteinu VP1 v buňkách po transfekci pMPyV LATE a v pozdní fázi infekce asociuje s buněčným cytoskeletem, pravděpodobně jaderným. Dále jsme prokázali vliv exprese strukturních proteinů na množství i rozpustnost laminů v buňce. Množství laminu A/C kleslo v důsledku exprese virových strukturních proteinů přibližně o 20 % a jeho rozpustnost vrostla v důsledku exprese VP1 o 60 %. Množství laminu B pak v buňkách transientně exprimujících protein VP1 vzrostlo přibližně dvakrát. V buňkách neexprimujících lamin A/C jsme nacházeli více proteinu VP1 v nukleoplazmě a pozorovali jsme velmi výraznou kolokalizaci s laminem B1. Námi získané výsledky naznačují významnou roli jaderné laminy v replikačním cyklu MPyV. V druhé části této práce jsme optimalizovali metody nukleofekce buněk RPTEC/hTERT1 pro práci s BK virovými proteiny, určili převážně jadernou a v menší míře cytoplazmatickou lokalizaci proteinu VP1 v buňkách RPTEC/hTERT1 transientně exprimujících protein VP1 a proteiny VP1 a VP2 a zkonstruovali expresní vektor nesoucí celou pozdní oblast BK virového genomu, jehož expresi jsme úspěšně ověřili. Tento konstrukt bude v budoucnu použit pro studium interakce pozdních proteinů BK viru s proteiny jaderné laminy.

Klíčová slova: MPyV, BKV, VP1, lamin A/C, lamin B, protein-proteinové interakce

Abstract

In this study, we focused on interactions of structural proteins of mouse polyomavirus (MPyV) and BK virus (BKV) with the nuclear lamina. Our goal was to examine whether and how can the virus, hence viral structural proteins, interact with the nuclear lamina and how would these interactions affect its properties. We supposed, that the expression of viral proteins would induce disintegration of the structure of nuclear lamina, thus enabling nuclear egress of virions in the late phase of infection. Viral structural proteins were expressed transiently in cells transfected with an expression vector pMPyV LATE. In these cells, VP1 was localized in a likewise manner as it shows in infected cells – mostly in a perinuclear area. Concurrently, defects in staining of nuclear lamina were observed in these cells, similarly to infected cells. Also, another expression vector was used in our experiments, the pMPyV mut3 VP1 encoding for a mutated protein VP1. When transiently expressed in cells, the mutated VP1 protein showed mostly diffuse nuclear localization. However, we observed significant morphological deformations and defective staining of the nuclear lamina. These observations imply an important role of VP1 in mechanical and biochemical properties alterations of the nuclear lamina in transfected and infected cells. We found out that the largest portion of VP1 in pMPyV LATE transfected and in infected cells associates with the cellular cytoskeleton, presumably nuclear. Further, we demonstrated that the expression of viral structural proteins in cells affects either amounts and solubility of nuclear lamins. The lamin A/C amount decreased upon expression of viral structural proteins by approximately 20 % and its solubility increased by 60 % upon VP1 expression. The lamin B amount increased about two times upon VP1 expression. In cells lacking the gene for lamin A/C, more VP1 diffused throughout a nucleoplasm and a distinct colocalization with lamin B was observed. In the next part of this work, we optimized the methods of RPTEC/hTERT1 cells nucleofection for further research of BK viral structural proteins. We observed nuclear and, to a lesser extent, cytoplasmic localization of VP1 in RPTEC/hTERT1 cells transiently expressing either VP1 or VP1 together with VP2. Most importantly, we constructed an expression vector coding for the late region of the BKV genome and verified its expression in cells as well. This construct will be used for further research of interactions of BK viral late proteins with proteins of the nuclear lamina.

Key words: MPyV, BKV, VP1, lamin A/C, lamin B, protein-protein interactions

Seznam zkratek

AAV2	s adenovirem asociovaný virus 2 („Adeno-associated virus type 2“)
AF	Alexa Fluor
b.	buněčná
BiP	protein vážící těžké řetězce imunoglobulinů („immunoglobulin heavy-chain-binding protein“)
BKV	BK virus
bp	pár bazí („base pair“)
ccdB	inhibitor gyrázy, tlumí růst bakteriálních kolonií
Cdk-2	cyklin dependentní kináza 2
CM	cytoplazmatická membrána
CPV	psí parvovirus („canine parvovirus“)
CTD	C-terminální doména
cyt	cytoplazmatická frakce rozpustných proteinů
Da	Dalton, atomová hmotnostní konstanta
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenylindol
ddH ₂ O	sterilní destilovaná voda
dH ₂ O	destilovaná voda
DMEM	Eaglovo médium modifikované Dulbeccem („Dulbecco's Modified Eagle's Medium“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dpi	dnů po infekci
dsDNA	dvojvláknová DNA („double-strand DNA“)
DTI	inhibitor trypsinu
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	virus Epstein-Barrové („Epstein-Barr virus“)
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová, případně její soli
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	s ER spojená degradační dráha proteinů („endoplasmic reticulum associated degradation“)
ET	efektivita transfekce
ffu	počet infekčních virových částic
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GD1a,b	buněčný gangliosidový receptor
GD2,3	buněčný gangliosidový receptor
GT1b	buněčný gangliosidový receptor
HCMV	lidský cytomegalovirus („human cytomegalovirus“)
hpi	hodin po infekci
hpt	hodin po transfekci
HRP	křenuvová peroxidáza („horseradish peroxidase“)
Hsc	protein příbuzný proteinům tepelného šoku („heat-shock cognate protein“)
Hsp	protein tepelného šoku („heat-shock protein“)

HSV-1, 2	Herpes simplex virus 1, 2
IF	imunofluorescence
InF	intermediární filamenta
IP	inhibitory proteáz
JCV	JC virus
JM	jaderná membrána
k	faktor zvětšení mikroskopu
kDa	kilo Dalton
LB médium	Lurita-Bertani médium
LINC	proteinový komplex propojující nukleoskeleton a cytoskeleton („linker of nucleoskeleton and cytoskeleton“)
LTAg	velký T antigen („large T-antigen“)
M	marker molekulových hmotností
MCMV	myší cytomegalovirus („murine cytomegalovirus“)
MCPyV	polyomavirus karcinomu Merkelových buněk („Merkel cell carcinoma polyomavirus“)
MOI	multiplicita infekce („multiplicity of infection“)
MPyV	myší polyomavirus
mRNA	messenger RNA
MTAg	střední T antigen („middle T-antigen“)
MVM	Minute virus of mice
n	počet
N/C-konec	amino/karboxy konec proteinu
NaOH	hydroxid sodný
NES	jaderný exportní signál („nuclear-export signal“)
NK	negativní kontrola
NLS	jaderný lokalizační signál („nuclear localisation signal“)
NPC	komplex jaderného póru („nuclear pore complex“)
NTD	N-terminální doména
nuc	jaderná frakce rozpustných proteinů
PAA	polyakrylamid
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PARP-1	poly(ADP-ribóza) polymeráza
PCR	polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
PDI	protein-disulfid-izomeráza
pel	frakce nerozpustných buněčných proteinů
pH	záporný dekadický logaritmus číselné hodnoty koncentrace vodíkových iontů v roztoku
Pin1	peptidyl-prolyl cis/trans izomeráza 1
PKC	proteinkináza C
rpm	otáčky za minutu („rotations per minute“)
RPMI médium	Roswell Park Memorial Institute médium
sd.	směrodatná odchylka
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfát – polyakrylamidová gelová elektroforéza

SGTA	malý protein alfa s TPR doménou bohatý na glutamin („small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha“)
SHV-1	virus prasečího herpesviru 1 („Suid herpesvirus 1“)
SOC médium	super optimální Brothovo médium s potlačováním katabolitů („Super Optimal Broth with Catabolite repression“)
STAg	malý T antigen („small T-antigen“)
SV40	opičí virus 40 („Simian vacuolating virus 40“)
T antigen	tumorigenní antigen
TBE	tris-borát-EDTA
TEMED	tetrametyletylendiamin
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
UL31, 34	virové proteiny HSV-1
UV	ultrafialové („ultra violet“)
v	objem
VLPs	viru podobné částice („virus-like particles“)
VP1	hlavní kapsidový protein VP1 („viral protein 1“)
VP2	minoritní kapsidový protein VP2 („viral protein 2“)
VP3	minoritní kapsidový protein VP3 („viral protein 3“)
VP4	virový protein 4
WB	western blot
wt	přírozený („wild type“)

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1. Polyomaviry	2
2.1.1. Struktura virionu.....	3
2.1.2. Genom	4
2.1.3. Hlavní kapsidový protein polyomavirů VP1	5
2.1.4. Minoritní kapsidové proteiny polyomavirů VP2 a VP3.....	8
2.1.5. Replikační cyklus polyomavirů	11
2.1.6. Strukturní proteiny MPyV a BKV a jejich interakce s buněčnými proteiny	15
2.2. Jaderná lamina	17
2.2.1. Jaderné laminy	19
2.3. Viry a jaderná lamina.....	23
2.3.1. Herpesviry.....	23
2.3.2. Parvoviry.....	24
2.3.3. Polyomaviry.....	24
3. Cíle práce.....	25
4. Materiál a metody	27
4.2. Práce s DNA.....	27
4.2.1. Vektory.....	27
4.2.2. Komerční soupravy používané při práci s DNA a vektory	28
4.2.3. Izolace plazmidové DNA	28
4.2.4. Restrikční štěpení DNA	29
4.2.5. Ligace genomu BK viru (self-cirkularizace lineární DNA)	29
4.2.6. Srážení DNA	29
4.2.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
4.2.8. Minipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou.....	30
4.2.9. Horizontální agarózová DNA elektroforéza	30
4.2.10. Sekvence DNA.....	31
4.2.11. Stanovení koncentrace DNA	31
4.2.12. Plazmid pEF-BKV-LATE.....	31
4.3. Práce s bakteriálními kulturami	32
4.3.1. Bakteriální kmeny	32
4.3.2. Kultivační média	32

4.3.3. Použitá selekční antibiotika	32
4.3.4. Kultivace bakterií na pevném médiu	33
4.3.5. Kultivace bakterií v suspenzi.....	33
4.3.6. Transformace bakterií elektroporací	33
4.3.7. Transformace bakterií tepelným šokem	33
4.3.8. Uchovávání bakterií.....	34
4.4. Práce s buněčnými kulturami	34
4.4.1. Použité pufry.....	34
4.4.2. Buněčné linie.....	34
4.4.3. Kultivační média	35
4.4.4. Viry	35
4.4.5. Pasážování buněk RPTEC/hTERT1.....	35
4.4.6. Pasážování buněk 3T6, NIH 3T3, 3T3 LMNA -/-, 3T3 LMNA +/-, HEK 293.....	35
4.4.7. Transfekce buněk RPTEC/hTERT1 nukleofekcí.....	36
4.4.8. Transfekce buněk NIH 3T3, WOP, 3T3 LMNA-/- a 3T3 LMNA +/- nukleofekcí.....	36
4.4.9. Transfekce buněk HEK 293 prostřednictvím kationických polymerů.....	37
4.4.10. Infekce buněk za účelem následné biochemické analýzy	37
4.4.11. Infekce buněk za účelem následného imunofluorescenčního značení proteinů... 37	
4.4.12. Infekce za účelem izolace virového potomstva	38
4.4.13. Izolace viru.....	38
4.4.14. Titrace virového inokula	39
4.5. Práce s proteiny	39
4.5.1. Protilátky	39
4.5.2. Lyze buněk pomocí RIPA pufru	41
4.5.3. Analýza rozpustnosti laminu A/C v buňkách exprimujících protein VP1	41
4.5.4. Frakcionace buněk.....	42
4.5.5. Nepřímé imunofluorescenční značení proteinů v buňkách	43
4.5.6. Denaturační proteinová elektroforéza SDS-PAGE	43
4.5.7. Western blot a imunodetekce proteinů.....	45
5. Výsledky	46
5.1. Myší polyomavirus	46
5.1.1. Studium lokalizace proteinu MPyV VP1 v infikovaných a transfekovaných buňkách	46
5.1.2. Vliv exprese strukturních proteinů na množství laminu A/C a laminu B1 v buňce .	53
5.1.3. Vliv exprese strukturních proteinů na rozpustnost laminu A/C v buňce	55

5.1.4. Studium lokalizace proteinu VP1 v buňkách s deletovaným genem pro lamin A ...	57
5.2. BK virus	63
5.2.1. Optimalizace transfekce savčích buněk RPTEC/hTERT1 nukleofekcí.....	63
5.2.2. Lokalizace proteinu VP1 v transfekovaných buňkách.....	64
5.2.3. Konstrukce expresního vektoru pBKV-LATE.....	66
5.5.4. Ověření exprese proteinu VP1 z plazmidu pEF-BKV-LATE v savčích buňkách.....	70
6. Diskuze.....	72
7. Závěr.....	79
8. Zdroje	81

1. Úvod

Objevení myšího polyomaviru (MPyV) a viru SV40 v 50. a 60. letech 20. století stálo na prahu mnoha důležitých objevů nejen ve virologii, ale i v molekulární biologii a přidružených disciplínách. Polyomaviry mají poměrně malý genom s malým počtem genů, jsou zcela závislé na hostitelském transkripčním a replikačním aparátu a mají onkogenní potenciál. V průběhu let tak sloužily jako modelové systémy pro studium virového replikačního cyklu, buněčné transformace a onkogeneze. Studium polyomavirů stálo i za objevem a pochopením principů sestřihu RNA, skládání replikačního komplexu a role enhancerů v genové expresi. Po objevu lidských polyomavirů BK viru a JC viru v 70. letech 20. stol., které mohou způsobovat vážné zdravotní komplikace u imunosuprimovaných jedinců, vzrostl zájem o výzkum polyomavirů nejen jakožto modelových systémů, ale i za účelem nalezení potenciálních antivirotik. Dalším silným impulzem pro výzkum byl potom objev viru karcinomu Merkelových buněk (MCPyV) v roce 2008, který je spojován s rozvojem jednoho z nejagresivnějších typů rakoviny kůže u starších a imunosuprimovaných osob. V posledních letech se tedy výzkum zaměřuje primárně na pochopení jednotlivých kroků virové replikace, které i přesto, že již uběhlo více než 60 let od objevu prvního polyomaviru, nebyly dodnes zcela objasněny. Virová replikace a morfogeneze virionů probíhá v jádře a infekční virové částice se uvolňují z buněk ještě před buněčnou lyzí. Jelikož jsou viriony příliš velké na to, aby byly ven z jádra transportovány jaderným pórem, musí existovat alternativní mechanismus, kterým virus překonává bariéru jaderného obalu. Největší překážkou na cestě skrze jaderný obal je bezpochyby jaderný cytoskelet tvořený jadernou laminou. U jiných virových čeledí, jako jsou například herpesviry, bylo prokázáno ovlivňování soudržnosti a mechanické odolnosti jaderné laminy fosforylací a následnou depolymerací jejích základních stavebních jednotek – jaderných laminů. Takto rozvolněnou laminou jsou pak virové částice schopné proniknout a pokračovat v transportu z jádra skrze jadernou membránu do cytoplazmy. Cílem naší práce bylo objasnit, zda polyomavirové strukturní proteiny interagují s jadernou laminou, jakou roli může hrát lamina v replikačním cyklu viru a zda virové strukturní proteiny mohou ovlivňovat její vlastnosti tak, aby se stala propustnější pro vznikající viriony. Pochopení principu a povahy těchto protein-proteinových interakcí a změn, které přítomnost virových strukturních proteinů ve struktuře jaderné laminy indukuje, může přispět k porozumění procesům v průběhu virové replikace, nalezení cílů antivirové terapie a vývoji potenciálních antivirotik. Experimenty jsme prováděli převážně na MPyV, který je mimo jiné díky poměrně snadné kultivaci v buněčných kulturách nejprozkoumanějším modelovým systémem z čeledi Polyomavirů.

2. Literární přehled

2.1. Polyomaviry

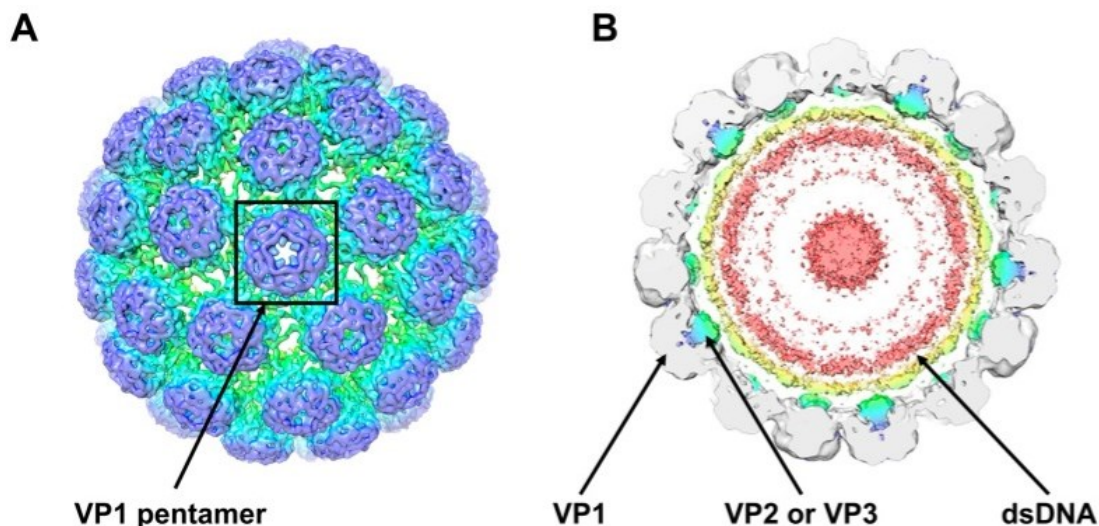
Polyomaviry jsou obligátními parazity savců, ryb, ptáků a členovců s tumorogenním potenciálem (Buck et al., 2016). První polyomavirus byl popsán při výzkumu leukémie u myši. Novorozeným transgenním myším byl injikován filtrát z homogenizovaných tkání dospělých leukemických myši a u některých jedinců se kromě očekávané generalizované leukémie vyvinuly nádory dělohy a slinných žláz. Tím byla prokázána přítomnost infekčního agens s tumorogenním potenciálem procházejícího filtrem s póry o velikosti 2 μm (Gross, 1953). Tímto agens, později charakterizovaným podrobněji jako SE polyoma virus v práci Eddyové a Stewartové, byl myší polyomavirus (MPyV) (Eddy & Stewart, 1959). Tomuto objevu vděčí polyomaviry za své jméno; *poly* znamená řecky mnoho a *oma* znamená nádor. Dalším objeveným polyomavirem byl opičí virus 40 (SV40). Byl opakovaně pozorován při infekci opičích buněčných kultur virovými inokuly známých virů jako neznámé agens způsobující vakuolizaci buněk. Byl izolován v roce 1960 (Sweet & Hilleman, 1960). V následujících 60. a 70. letech byly postupně objeveny dva lidské polyomaviry; JC virus (JCV) v mozku pacienta, jenž podlehl progresivní multifokální leukoencefalopatii, a BK virus (BKV) v moči pacienta po transplantaci ledvin (Gardner et al., 1971; Padgett et al., 1971; Zu Rhein & Chou, 1965). S objevem lidských polyomavirů vzrostl zájem o jejich zkoumání a do dnešního dne bylo objeveno 98 zástupců polyomavirů, z nich 13 je lidských. Kromě 9 zatím nezařazených zástupců jsou polyomaviry rozděleny na základě podobnosti sekvence virového proteinu velkého T antigenu do 4 rodů – *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- a *Deltapolyomavirus* (Calvignac-Spencer et al., 2016; Laskar et al., 2021). Za zmínku stojí objev z roku 2008, kdy byla poprvé prokázána přímá souvislost vzniku rakoviny kůže u člověka s přítomností polyomaviru. Tento virus byl pojmenován polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV) (Feng et al., 2008). V současné době jsou nejvíce studovanými polyomaviry zástupci infikující člověka a způsobující zdravotní komplikace u imunosuprimovaných či starších jedinců, primárně BKV, JCV a v posledních letech MCPyV. Nejstudovanějšími a nejprozkoumanějšími modelovými zástupci jsou potom opičí virus SV40 a myší virus MPyV (tab. 1).

Polyomavirus	Zkratka	Rod	Hostitel	Izolace
Myší polyomavirus	MPyV	<i>Alphapolyomavirus</i>	myš	Gross, 1953
Opičí virus 40	SV40	<i>Betapolyomavirus</i>	opice	Sweet & Hilleman, 1960
BK virus	BKV	<i>Betapolyomavirus</i>	člověk	Gardner et al., 1971
JC virus	JCV	<i>Betapolyomavirus</i>		Padgett et al., 1971
Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk	MCPyV	<i>Alphapolyomavirus</i>		Feng et al., 2008

Tabulka 1. Přehled nejvýznamnějších lidských polyomavirů a modelových polyomavirů.

2.1.1. Struktura virionu

Polyomaviry jsou malé (40-45 nm) neobalené viry s genomem tvořeným jednou kopií dvojvláknové kruhové DNA. Jejich ikosahedrální kapsida se skládá z 360 kopií hlavního kapsidového proteinu VP1 tvořícího 72 pentamerů a 72 kopií minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3, které se nachází uvnitř dutiny každého pentameru (obr. 1) (Barouch & Harrison, 1994; Rayment et al., 1982). Pentamery VP1 se vytváří samovolně nezávisle na minoritních proteinech a posttranslačních modifikacích proteinu VP1 *in vivo* i *in vitro*. Samotné pentamery se do struktury kapsidy samouspořádávají za vhodné koncentrace vápenatých iontů (Ishizu et al., 2001; Salunke et al., 1986). Jsou vzájemně propojeny pomocí kovalentních vazeb C-konce proteinu VP1 stabilizovaných právě vápenatými ionty a disulfidických vazeb (Garcea et al., 1987; Stehle & Harrison, 1996). Tato schopnost skládání pentamerů a vytváření částic podobných viru (virus-like-particles, VLPs) nezávisle na virové replikaci je velice slibným nástrojem molekulární medicíny, ať už by se jednalo o dopravu terapeutických látek na místo určení v organismu či přípravu vakcín.



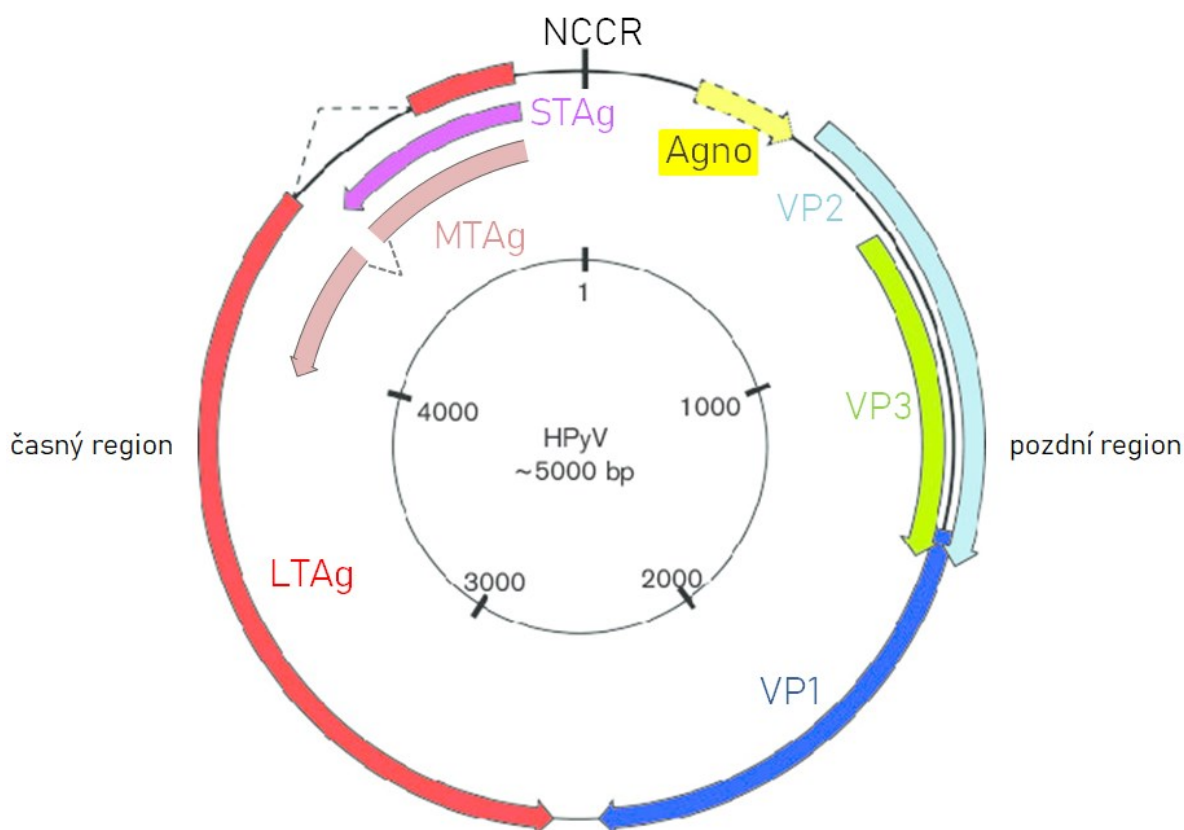
Obr. 1 Uspořádání strukturních proteinů polyomavirů. **A)** Pohled zvnějšku na 3D strukturu virionu tvořenou VP1 pentamery. **B)** Průřez 3D strukturou virionu. Šedá barva reprezentuje VP1 pentamer, modro-zelená minoritní proteiny v centrální dutině VP1 pentamerů, oranžová značí dsDNA. Převzato z Helle et al., 2017.

2.1.2. Genom

Velikost genomu polyomavirů se pohybuje od 3962 bp do 7369 bp. Většina genomů má však velikost 5-5,5 kb (Laskar et al., 2021; Soeda et al., 1980). Uvnitř kapsid SV40, BKV a MPyV byly nalezeny buněčné histony, kromě histonu H1, asociované s virovou DNA. Díky nim je genom uspořádán v kapsidě do struktury minichromozómu (Fang et al., 2010; Forstová et al., 1993; Frearson & Crawford, 1972; Lake et al., 1973). Toto uspořádání se předpokládá i u dalších polyomavirů.

Genom sestává z časného regionu, nekódující oblasti a pozdního regionu (obr. 2). Časný region obsahuje geny proteinů s regulační funkcí exprimované v časně fázi infekce. Nazývají se tumorogenní antigeny (TAg) a bývají obvykle dva, velký T antigen (LTAg) a malý T antigen (MTAg). U hlodavců nacházíme ještě třetí, střední T antigen (MTAg). Všechny T antigeny mají společnou část prvního konzervovaného exonu, takže výsledné proteiny sdílí N-konec. Nekódující oblast má regulační funkci; obsahuje replikační počátek a regulační sekvence (promotory a enhancer) pro časnou a pozdní transkripci. Pozdní region leží na komplementárním vlákně a v opačném směru kóduje strukturní proteiny. Exprese pozdní oblasti probíhá současně s replikací virové DNA (Moens et al., 2017). Strukturní proteiny bývají minimálně dva, majoritní VP1 a minoritní VP2 (Schowalter & Buck, 2013). Obvykle však nacházíme u polyomavirů celkem 3 strukturní proteiny, majoritní VP1 a minoritní VP2 a VP3, jak je tomu i v případě MPyV (Mayer & Dörries, 1991; Yang & Wu, 1979). BKV a SV40 exprimují dokonce čtyři strukturní proteiny, VP1, VP2, VP3 a VP4 (Henriksen et al., 2016). VP4 však není součástí virových kapsid. mRNA pro všechny strukturní proteiny vznikají z jednoho pozdního transkriptu (Siddell & Smith, 1978). Sekvence kódující VP2 a VP3 se nacházejí ve stejném otevřeném čtecím rámci a liší se pozicí

počátečních kodonů (Good et al., 1988). Vznikající protein VP3 je potom o jednu třetinu zkrácenou verzí proteinu VP2, přičemž C-konce obou proteinů se shodují. VP1 se nachází v jiném otevřeném čtecím rámci. U polyomavirů BKV, JCV a SV40 nacházíme bezprostředně před genem pro VP1 ještě gen pro protein s regulační funkcí nazývaný agnoprotein (Fiers et al., 1978; Frisque et al., 1984; Helle et al., 2017).



Obr. 2 Uspořádání genomu polyomavirů. Pozdní geny leží na vlákně komplementární k vlákně kódujícímu časné proteiny. Exony vyznačené plnými čarami jsou relevantní pro MPyV, přerušovaná linka agnoproteinu platí pouze pro BKV, JCV a SV40. **NCCR** – nekódující časný region; **LTAg** – velký T antigen; **MTAg** – střední T antigen; **STAg** – malý T antigen; **Agno** – agnoprotein; **VP1** – majoritní strukturní protein; **VP2**, **VP3** – minoritní strukturní proteiny. Upraveno podle Feltkamp et al., 2013.

2.1.3. Hlavní kapsidový protein polyomavirů VP1

Hlavní kapsidový protein VP1 je základní stavební jednotkou virové kapsidy. Jeho terciární struktura byla detailně popsána již v roce 1991 (Liddington et al., 1991). Tento 45kDa protein se dá při pohledu na terciární strukturu rozdělit na tři oblasti, jimiž jsou N-koncová doména (NTD), centrální doména a C-koncová doména (CTD) (obr. 3).

V NTD se nachází sekvenčně nespecifická DNA vazebná doména (Hurdiss et al., 2016; Moreland et al., 1990). Uvnitř virionu váže tato doména virový minichromozom a nahrazuje tak v nukleozomálním uspořádání chybějící hostitelský histon H1 (Carbone et al., 2004; Hurdiss et al., 2016). U MPyV byl popsán v NTD jaderný lokalizační signál (NLS) a u BKV se jeho přítomnost přepokládá na základě podobnosti nukleotidové sekvence s NLS viru

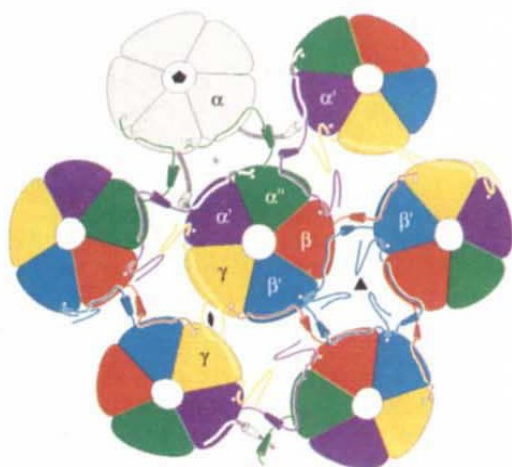
SV40 (Ishii et al., 1994; Moreland & Garcea, 1991). Centrální oblast VP1 je tvořena α -helixy a β -listy propojenými smyčkami, z nichž tři se podílí na interakci s buněčnými receptory při adsorpci virionů k povrchu buňky (obr. 3 A). Dlouhá CTD pak zprostředkovává vazbu mezi pentamery (obr. 3 B) (Garcea et al., 1987). Zároveň spolu s jednou ze smyček centrální domény přispívá ke stabilitě těchto vazeb interakcí s vápenatými ionty (Liddington et al., 1991; Stehle & Harrison, 1996). V neposlední řadě interaguje CTD pomocí hydrofóbních interakcí také s minoritním proteinem uvnitř prohlubně pentameru (obr. 3 C) (Cai et al., 1994; Chen et al., 1998).

Protein VP1 je cílem mnoha posttranslačních modifikací, jako jsou fosforylace, sulfonylace, acetylace, hydroxylace, metylace, cysteinylace, formylace, oxidace a další (Bolen et al., 1981; Fang et al., 2010; Fattaey & Consigli, 1989). Tyto posttranslační modifikace dávají vzniknout různým variantám VP1 (Fang et al., 2010). Ačkoli funkce většiny těchto modifikací zůstává zatím neznámá, jako významná se již ukázala fosforylace v centrální oblasti proteinu VP1. Probíhá na serinových a threoninových zbytcích exponovaných na povrchu virionu a je pravděpodobně důležitá pro vazbu na buněčný receptor a pro morfogenezi virionu (Chen et al., 2011; Garcea et al., 1985)

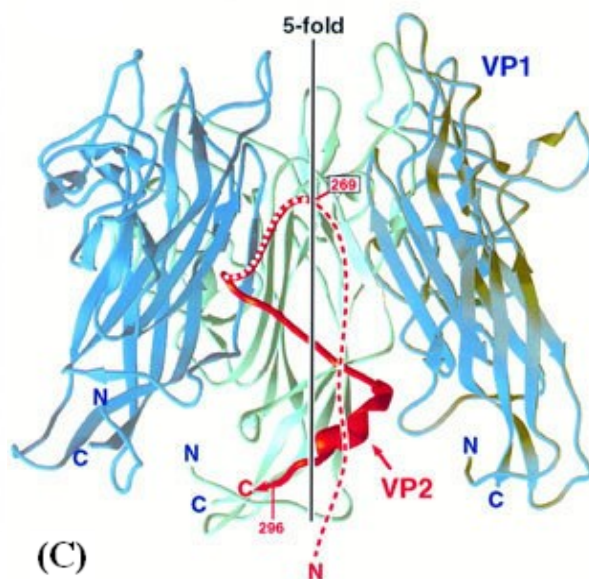
Kromě strukturní funkce má VP1 i důležité funkce v životním cyklu viru. Ačkoli je v rámci čeledi jeho sekvence značně konzervovaná, tak určuje buněčnou specifitu a díky krátkým variabilním oblastem je zodpovědný za antigenní variabilitu (Neu et al., 2011; 2013). Zprostředkovává přichycení viru na buněčný povrch, účastní se internalizace a transportu virionů ve váčcích do ER a pravděpodobně i penetrace membrány ER a vstupu rozvolněných virových částic do cytoplazmy (Daniels et al., 2006; Jiang et al., 2009; Richterová et al., 2001). V jádře hraje pravděpodobně roli i v regulaci transkripce časných genů (Carbone et al., 2006). Translatovaný VP1 potom vytváří v cytoplazmě komplexy se vznikajícími virovými minoritními strukturními proteiny a zajišťuje jejich transport do jádra (Jiang et al., 2009). Část nově vznikajícího VP1 v cytoplazmě zůstává a stabilizuje mikrotubulární síť, která se ukazuje jako důležitá pro uvolnění viru z buňky (Horníková et al., 2017; Sanjuan et al., 2003). Byla prokázána i interakce VP1 s mikrotubuly mitotického vřeténka, což vede k zablokování buněčného cyklu v G2/M fázi (Horníková et al., 2017; Palková et al., 2000). Prodloužení S fáze a zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi jsou přitom zjevně důležité faktory pro dokončení replikačního cyklu viru.



(A)



(B)



(C)

Obr. 3 Terciární struktura proteinu VP1. (A) Zeleně jsou vyznačeny α -helixy a červeně β -listy. Fialové šipky označují smyčky centrální domény exponované vně virionu a zprostředkovávající kontakt s povrchovými buněčnými receptory. Oranžově je označena smyčka vytvářející spolu s C-koncovou doménou vazebné místo pro vápenaté ionty. Upraveno podle Chavez-Calvillo, 2014. (B) Schematické znázornění interakcí mezi pentamery, kdy každá barva reprezentuje monomer VP1 a jeho C-koncovou doménu tvořenou helixem (trojúhelník odpovídající barvy) a částí zasahující do struktury sousedního pentameru. Převzato z Liddington et al., 1991. (C) Příčný průřez VP1 pentamerem s minoritním proteinem VP2 uloženým v dutině pentameru. Převzato z Chen et al., 1998.

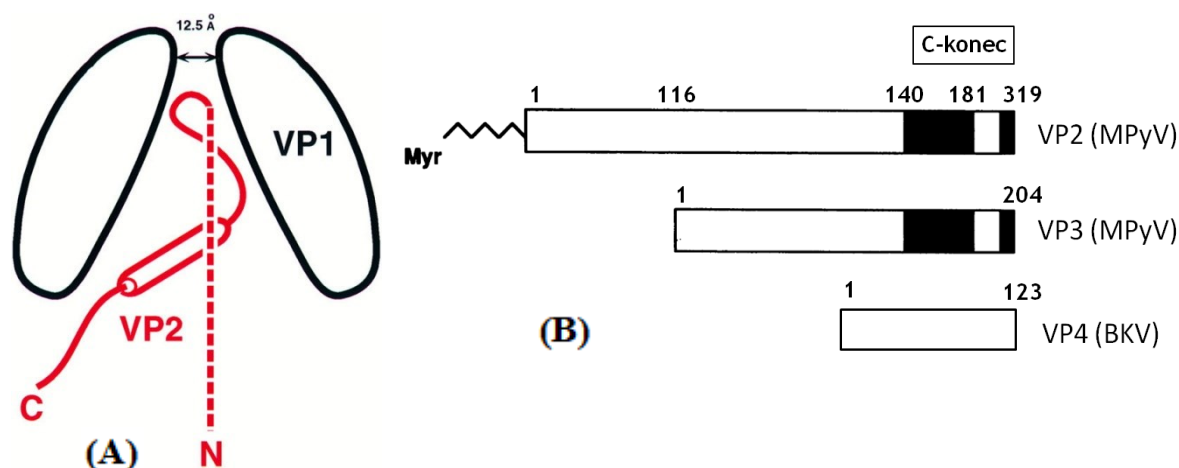
2.1.4. Minoritní kapsidové proteiny polyomavirů VP2 a VP3

Většina polyomavirů včetně MPyV exprimuje dva minoritní proteiny, VP2 (35 kDa) a VP3 (23 kDa). BKV kóduje a pravděpodobně i exprimuje ještě třetí minoritní protein označovaný VP4. Jako potenciální produkt tohoto genu byl pozorován 13,9kDa protein. Protein VP4 není esenciální pro infektivitu viru a není součástí kapsid BKV (Henriksen et al., 2016). Některé polyomaviry exprimují i pouze jeden z minoritních proteinů (Schowalter & Buck, 2013). V každém případě se však v rámci kapsidy nachází v dutině každého pentameru VP1 jeden minoritní protein VP2 nebo VP3 (obr. 4 A) (Barouch & Harrison, 1994).

Vzhledem k překryvu genů pro proteiny VP2 a VP3 jsou dvě třetiny VP2 identické s aminokyselinovou sekvencí celého proteinu VP3 (obr. 4 B). Společná CTD VP2/VP3 zprostředkovává interakci s VP1 pentamerem (Chen et al., 1998). Stejně jako hlavní kapsidový protein VP1 obsahují minoritní proteiny VP2/VP3 sekvenci NLS. Na rozdíl od proteinu VP1, jenž má NLS lokalizován na N-konci, se v případě minoritních proteinů VP2 a VP3 nachází NLS v blízkosti C-konce proteinů (Chang et al., 1992; Nakanishi et al., 2002). Mutace v NLS proteinů VP2 a VP3 značně snižuje efektivitu transportu virionů z cytoplazmy do jádra. NLS je tedy důležitý, ačkoli ne absolutně nezbytný, v časných fázích infekce (Bennett et al., 2015). V pozdní fázi infekce nevstupují nově translatované minoritní proteiny do jádra buněk nezávisle, ačkoli obsahují NLS, ale v komplexu s proteinem VP1. Tím je zajištěna ideální stechiometrie hlavního a minoritních strukturních proteinů v jádře pro efektivní skládání virionů (Barouch & Harrison, 1994; Forstová et al., 1993; Soldatova et al., 2018). Při transfekci hmyzích buněk a expresi virových proteinů bez současné replikace virové DNA je pro minoritní proteiny pro vstup do jádra nutná přítomnost proteinu VP1. Ten do jádra vstupuje i nezávisle na přítomnosti minoritních proteinů (Montross et al., 1991). V případě exprese proteinů v savčích buňkách je situace opačná. Protein VP1 do jádra nezávisle nevstupuje a jeho jaderná lokalizace je podmíněna přítomností alespoň jednoho z minoritních proteinů (Horníková et al., 2017; Soldatova et al., 2018). Stejně tak ani minoritní proteiny bez současné exprese proteinu VP1 do jádra nevstupují (Huerfano et al., 2010).

Ve společné CTD proteinů VP2 a VP3 se uskutečňuje i většina posttranslačních úprav. U obou proteinů byla v této oblasti identifikována formylace, oxidace, dioxidace, karboxymetylace a fosforylace (Fang et al., 2010). Právě fosforylace minoritních proteinů je pro BKV esenciální pro dokončení produktivní infekce (Chen et al., 2011). Úpravy N-koncových částí proteinů se mezi proteiny VP2 a VP3 liší. Zatímco N-konec proteinu VP3 je acetylován (Fang et al., 2010), protein VP2 je v NTD kotranslačně myristylován (obr. 4 B). Sekvence, v níž myristylace probíhá, je mezi polyomaviry značně konzervovaná (Streuli & Griffin, 1987). Pokud je protein VP2 mutován v místě vazby myristylové skupiny a nemůže

být myristylován, dochází ke snížení produkce infekčních virionů. Myristylovaný VP2 tak pravděpodobně zastává určitou funkci ve skládání virionů (Mannová et al., 2002). Zároveň se u virových mutant bez myristylace projevuje snížená schopnost vstupu viru do buněk, což může indikovat určitou roli i v procesu interakce s membránou a internalizace viru (Sahli et al., 1993). Myristylované proteiny nacházíme i u jiných čeledí virů jako například *Picornaviridae* či *Reoviridae* (rotaviry, reoviry) a myristylace je u každé z nich nějakým způsobem spojována se vstupem viru do buňky (Chow et al., 1987; Clark & Desselberger, 1988; Nibert et al., 1991).



Obr. 4 Minoritní strukturní proteiny polyomavirů a BKV VP4. (A) Schematické znázornění interakce proteinu VP1 a minoritního strukturního proteinu VP2 v dutině pentameru (boční pohled). Převzato z Chen et al., 1998. **(B)** Schematické znázornění proteinů MPyV VP2 a VP3 a BKV VP4. Černě je vyznačena oblast interagující s dutinou VP1 pentameru. BKV VP4 není strukturním proteinem a není inkorporován v kapsidách. Upraveno podle Barouch & Harrison, 1994; Henriksen et al., 2016.

Ačkoli minoritní strukturní proteiny nejsou esenciální pro samotné skládání virových kapsid (Leavitt et al., 1985; Montross et al., 1991), virové mutanty s deletovanými geny pro VP2/VP3 mají výrazně sníženou či zcela inhibovanou schopnost infekce a produkce virového potomstva (Gasparovic et al., 2006; Henriksen et al., 2016; Mannová et al., 2002). Ukázalo se, že pro syntézu všech variant různě posttranslačně modifikovaných proteinů VP1 je nutná ko-exprese proteinu VP2 (Forstová et al., 1993; Li et al., 1995). Dá se usuzovat, že minoritní proteiny mění interakci s proteinem VP1 jeho konformaci a zpřístupňují tak různé aminokyselinové zbytky VP1 pro buněčné kinázy. Vazba minoritních proteinů tak může ovlivňovat konformaci proteinu VP1 způsobem, který je nutný pro efektivní enkapsidaci genomu.

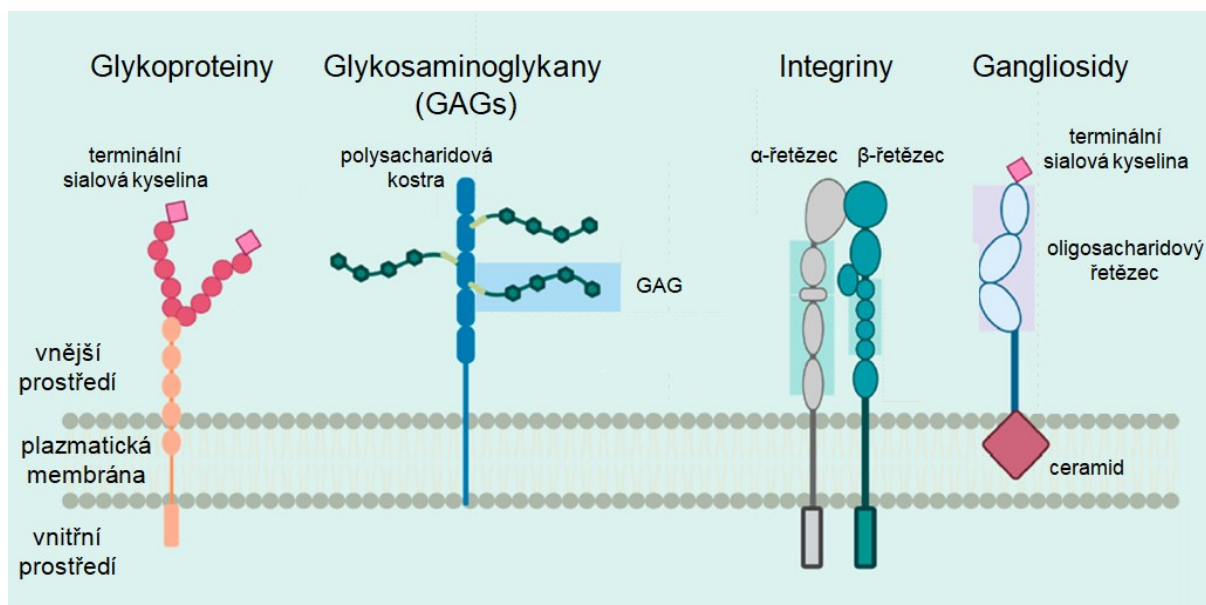
V terciární struktuře proteinů VP2 i VP3 nacházíme velké množství α -helixů, 57 % pro VP2 a 46 % pro VP3 (Burkert et al., 2014). U proteinu VP2 viru SV40 nacházíme 6 hydrofóbních domén, z nichž 3 mohou fungovat jako transmembránové (Giorda et al., 2013). Studie virových mutantů v proteinu VP2 s mutací vždy v jedné ze tří hydrofóbních

transmembránových domén poukazuje na další možné role minoritních proteinů v replikačním cyklu viru. Dle mutované domény bylo u viru pozorováno snížení afinity k buněčným membránám, ztráta schopnosti asociovat s membránou endoplazmatického retikula (ER) a nemožnost izolace virového potomstva z buněčných kultur infikovaných mutantním virem, což značí defektní morfogenezi virionů. Tyto výsledky dále ukazují na roli VP2 v iniciálním kontaktu s membránou ER, vazbě k membráně a stabilizaci této vazby a zároveň v penetraci membrány a uvolnění částic do cytosolu (Huérfino et al., 2017). Kontakt s membránou a její penetrace je umožněna díky konformačním změnám ve struktuře kapsidy v lumen ER. Dochází k odhalení hydrofóbní NTD VP2, která se zanoří do membrány ER, přičemž virová částice penetruje membránu a dostává se do cytosolu (Magnuson et al., 2005; Rainey-Barger et al., 2007). U viru SV40 byla prokázána přímo viroporinová aktivita minoritních proteinů (Giorda et al., 2013).

Kromě zmíněných funkcí souvisejících s morfogenezí infekčních vironů a transportem do jádra v časných fázích infekce mohou minoritní proteiny zastávat i určitou roli v regulaci replikace virové DNA. Minoritní proteiny viru SV40 silně interagují s LTA_g a zvyšují tak afinitu a sílu vazby LTA_g k replikačnímu počátku. Ve výsledku je potom replikace virové DNA je signifikantně vyšší v přítomnosti VP2 (Saribas et al., 2015).

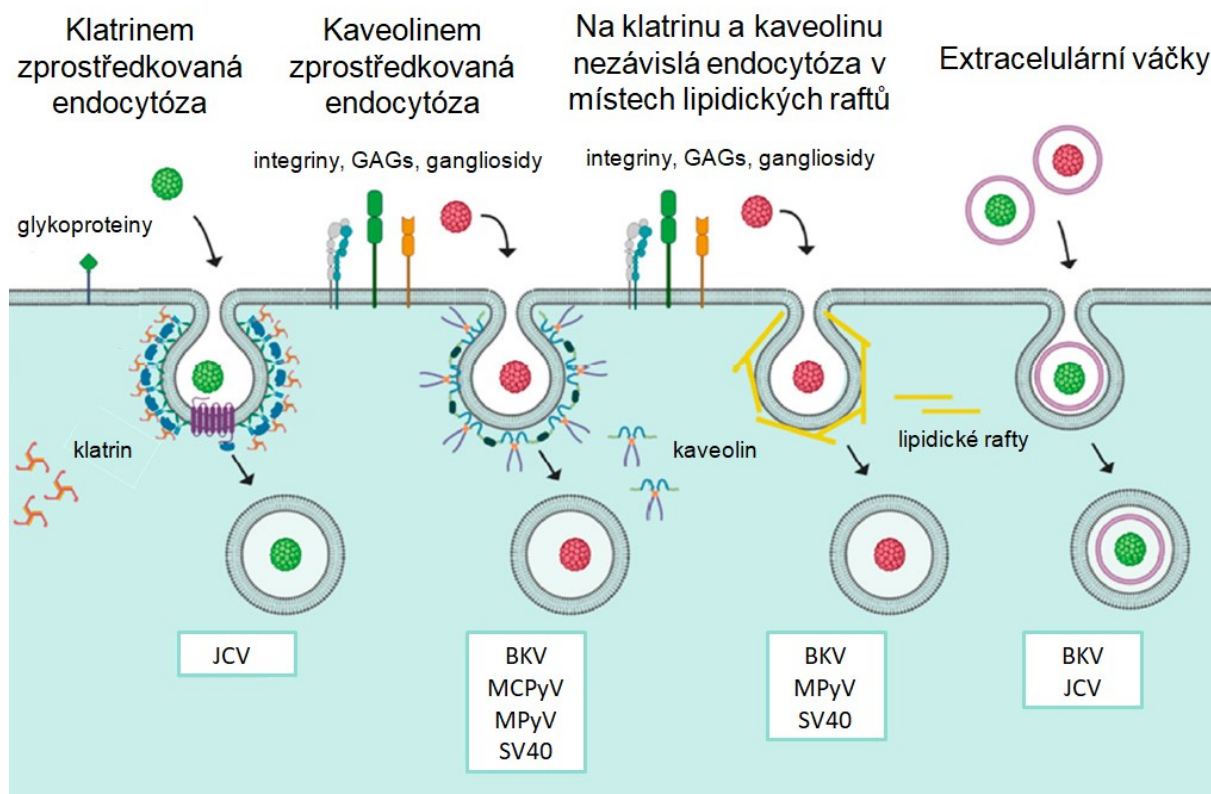
2.1.5. Replikační cyklus polyomavirů

Polyomaviry se obvykle váží na povrch buňky přes gangliosidové receptory (SV40, MPyV, BKV, MCPyV, JCV) (Komagome et al., 2002; Neu et al., 2013; O'Hara et al., 2014; Tsai et al., 2003). Jako koreceptory mohou sloužit MHC I (SV40), integrinové receptory (MPyV), glykoproteiny (JCV, BKV) či glykosaminoglykany (JCV, MCPyV) (obr. 5) (Breau et al., 1992; Caruso et al., 2003; Dugan et al., 2005; Liu et al., 1998; Schowalter et al., 2011). Vazba na receptory probíhá přes VP1, přičemž část proteinu, která je receptorem rozpoznávána, se mezi zástupci liší a určuje tak hostitelskou a buněčnou specifitu viru (Neu et al., 2011; Ströh et al., 2015).



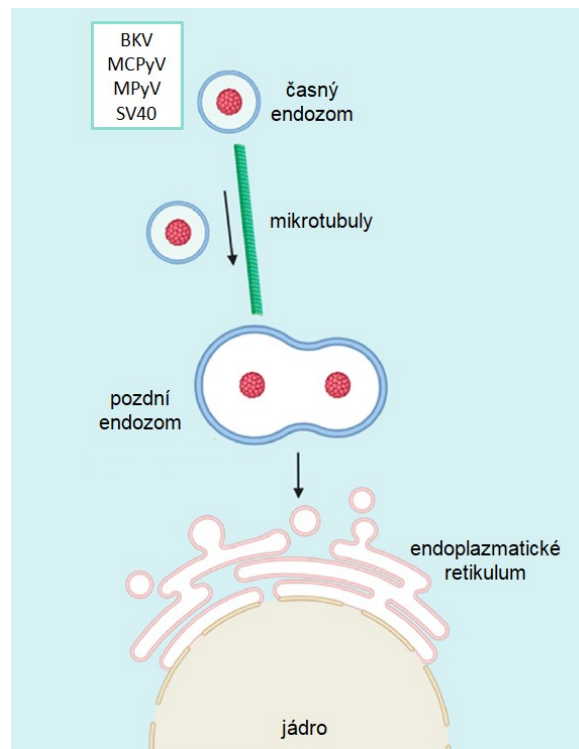
Obr. 5 Buněčné povrchové receptory a koreceptory běžně rozpoznávané polyomaviry. Interakce probíhá přes hlavní kapsidový protein VP1. Sialované glykoproteinové receptory jsou využívány JCV, glykosaminoglykany BKV, JCV a MCPyV, integrinové receptory váže MPyV a gangliosidové receptory jsou nejběžnějšími receptory polyomavirů a jsou využívány SV40, MPyV, BKV, JCV a MCPyV. Upraveno podle Mayberry & Maginnis, 2020.

Internalizace virové partikule probíhá nejčastěji kaveolární endocytózou (SV40, MPyV, BKV, MCPyV) (Anderson et al., 1996; Becker et al., 2019; Moriyama et al., 2007; Richterová et al., 2001), s výjimkou JCV, kde je uskutečněna klatrinem zprostředkovanou endocytózou (Pho et al., 2000). Další možností vstupu viru do buněk je na klatrinu a kaveolinu nezávislá endocytóza v místech lipidických raftů (MPyV, BKV, SV40) (Damm et al., 2005; Liebl et al., 2006; Zhao et al., 2016). Velmi recentně byla u viru BKV a JCV prokázána i schopnost infikovat buňky prostřednictvím extracelulárních váčků odškrcených z plazmatické membrány infikovaných buněk, díky nimž virus zcela uniká imunitnímu systému vně buněk (obr. 6) (Handala et al., 2020; Morris-Love et al., 2019).



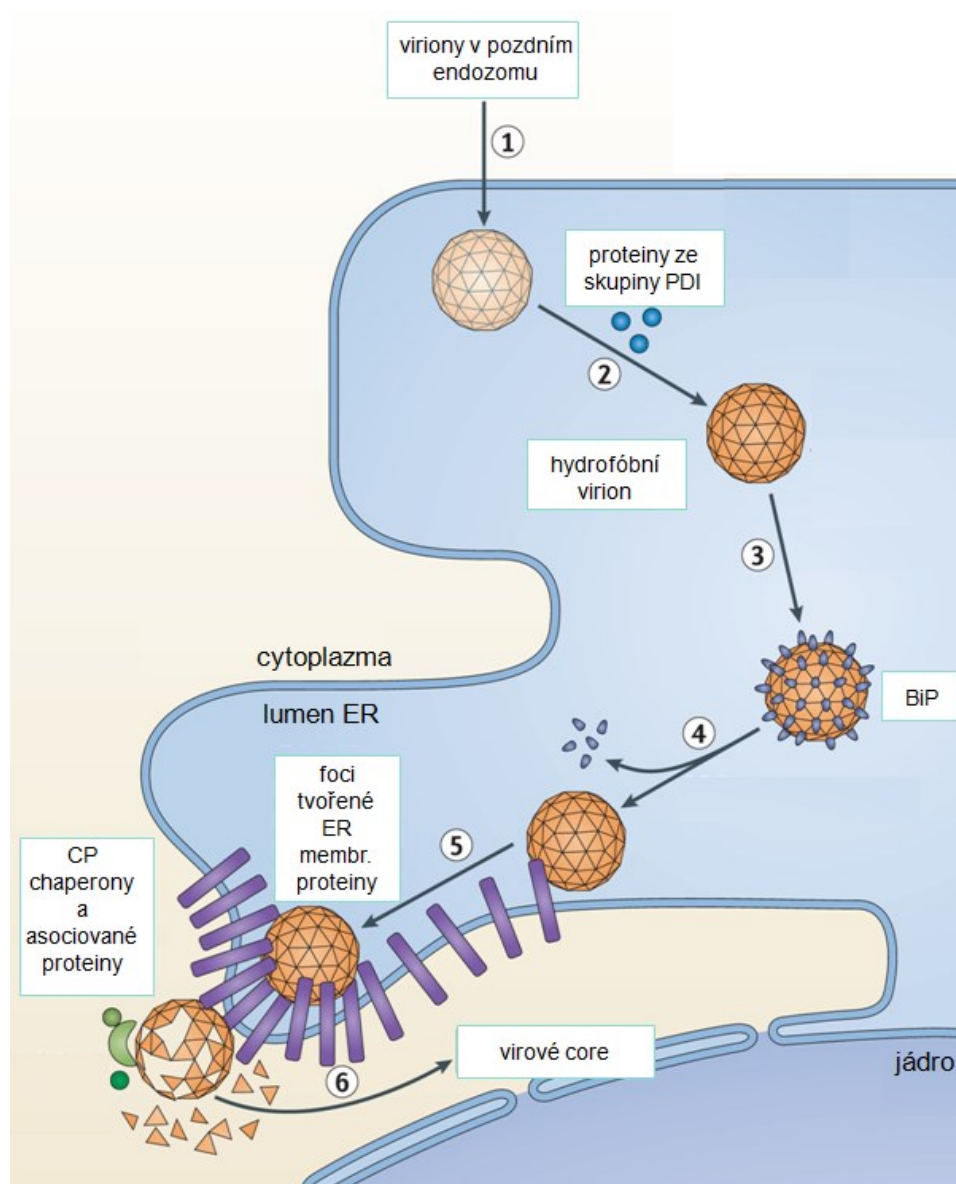
Obr. 6 Cesty vstupu polyomavirů do buněk. Po interakci virové partikule s membránovým receptorem prostřednictvím hlavního kapsidového proteinu VP1 dochází k invaginaci membrány a internalizaci virové partikule v membránovém váčku. Váčky vznikají na principu klatrinové, nebo kaveolinové endocytózy, na klatrinu a kaveolinu nezávislé endocytózy v místech lipidických membránových raftů a nebo internalizací extracelulárních váčků. Popsány pouze receptory a proteiny zmiňované v této práci. Virus zobrazen červeně či zeleně. GAGs – glykosaminoglykany. Upraveno podle Mayberry & Maginnis, 2020.

Virus je ve váčkách transportován pomocí mikrotubulů do ER (obr. 7). Pro MPyV a BKV je zásadní prostředí pozdního endozomu s nízkým pH, které indukuje již během transportu konformační změny proteinu VP1 destabilizující kapsidu. Tyto změny jsou nutné pro následné rozvolnění virionu v ER a produktivní infekci (Eash et al., 2004; Liebl et al., 2006).



Obr. 7 Transport virionů z cytoplazmatické membrány do endoplazmatického retikula. Virová částice se invaginací membrány dostává do časného endozomu, který se stává pozdním endozomem a následně splývá s ER a virion je uvolněn do ER lumen. Transport probíhá pomocí mikrotubulů. Virus zobrazen červeně. Upraveno podle Mayberry & Maginnis, 2020.

Viriony jsou v rámci lumen ER a posléze do cytoplazmy přes membránu ER transportovány za účasti některých proteinů ERAD dráhy, které běžně zodpovídají za transport špatně sbalených proteinů z ER a jejich degradaci v proteasomu (obr. 8) (Bennett et al., 2013). Nejprve v lumen ER katalyzují buněčné endoplazmatické protein-disulfid-izomerázy přeskupení a redukci disulfidických vazeb mezi VP1 proteiny (Gilbert et al., 2006). Dochází k lokálnímu rozbalení C-konce VP1, narušení vazeb mezi VP1 pentamery a celkovému rozvolnění kapsidy. Zároveň jsou tak odhaleny hydrofóbní domény minoritních proteinů (Norkin et al., 2002). Na hydrofóbní částici se váže protein BiP a asistuje jejímu transportu k membráně ER (Geiger et al., 2011). Poté se BiP uvolňuje, hydrofóbní domény minoritních proteinů se zanořují do membrány ER a virové partikule jsou v místech foci tvořených endoplazmatickými membránovými proteiny transportovány do cytoplazmy (Huérffano et al., 2017; Inoue & Tsai, 2011). Transport partikule skrze membránu umožňují cytoplazmatické proteiny a chaperony asociované s membránovými proteiny ER (Walczak et al., 2014). Během penetrace membrány se částice ještě více rozvolňují a následuje jejich transport do jádra. Jaderný pór je schopen pojmout molekuly do velikosti 39 nm a průměr intaktního virionu polyomavirů je 40-45 nm (Panté & Kann, 2002). Proto je rozvolnění virové částice v lumen ER a při transportu do cytoplazmy esenciálním krokem pro úspěšný průběh infekce.



Obr. 8 Procesování virových partikul v endoplazmatickém retikulu a uvolnění do cytoplazmy pro transport do jádra. (1) Pozdní endozom obsahující virovou částici splývá s ER a virion je tak uvolněn do lumen ER. **(2)** Zde je částice pomocí proteinů ze skupiny protein-disulfid-izomeráz rozvolněna a jsou odhaleny hydrofóbní domény minoritních proteinů. **(3)** Na hydrofóbní části se váže za asistence dalších proteinů protein BiP. **(4)** BiP se poté podílí na transportu rozvolněné částice k membráně ER a za účasti dalších proteinů je z částice vyvázán. **(5)** Rozvolněný virion se hydrofóbními doménami zanořuje do membrány ER a indukuje reorganizaci endoplazmatických membránových proteinů do membránových foci. **(6)** Součinností proteinů membránových foci a cytoplazmatických chaperonů a asociovaných proteinů penetruje virová částice membránu ER. Během penetrace a následně v cytoplazmě je virion ještě více rozvolněn a virové core je transportováno do jádra. PDI – protein-disulfid-izomerázy; ER – endoplazmatické retikulum, CP – cytoplazmatické. Upraveno podle Ravindran et al., 2016.

V jádře nejprve probíhá transkripce časných virových proteinů. Hlavním a esenciálním regulátorem virové replikace je velký T antigen (LTA_g). Navozuje časně po infekci v buňkách S fázi buněčného cyklu a řídí přepnutí transkripce z časných virových promotorů na replikaci virové DNA a posléze transkripci z pozdních virových promotorů. Nejprve se váže spolu s buněčnými proteiny do míst virových časných promotorů a po zvýšení jeho koncentrace v buňce se váže i do nízkoafinitních vazebných míst po směru transkripce od časných promotorů a fyzicky tak brání další transkripci časných genů RNA polymerázou II (An et al., 2012; Harris et al., 1996; White & Khalili, 2006). Zároveň stoupající počet kopií replikovaných virových genomů má v jádře za následek vyvazování buněčných represorů z promotorů pozdních genů a přepnutí na transkripci z pozdních promotorů regulovaných vazbou LTA_g a buněčných faktorů (Alwine et al., 1977; Gruda et al., 1993). Regulace transkripce, replikace virové DNA a vstupu do S fáze se účastní i malý T antigen a u hlodavčích polyomavirů (MPyV) navíc střední T antigen (Berger & Wintersberger, 1986; Chen & Fluck, 2001).

Skládání virionů polyomavirů probíhá taktéž v jádře, a to v místech tzv. „virových továren“ (Erickson et al., 2012). Z cytoplazmy se sem transportují všechny tři kapsidové proteiny v komplexech s buněčnými chaperony. Buněčné chaperony v cytoplazmě brání předčasnému skládání virionů a v jádře napomáhají skládání virových kapsid a přispívají invazi CTD VP1 do sousedního pentameru (Cripe et al., 1995). Skládání kapsid kolem virových genomů může v jádře napomáhat i vysoká koncentrace vápenatých iontů.

Mechanismus uvolnění virového potomstva z buňky nebyl zatím přesně popsán. Některé studie popisují uvolnění virionů prostřednictvím lýzy buněk, jiné uvádí uvolnění virionů z intaktních buněk (Allison & Black, 1967; Clayson et al., 1989).

U polyomavirů, jež ho kódují, má důležitou roli v morfogenezi a uvolnění virionů z jádra a buňky i agnoprotein. Kromě regulačních funkcí, které zastává spolu s LTA_g v průběhu virové transkripce a replikace, byla prokázána i viroporinová funkce v pozdní fázi infekce. Agnoprotein ovlivňuje efektivní zabalení DNA do virových kapsid a jakožto viroporin destabilizuje jak jadernou, tak cytoplazmatickou membránu a usnadňuje tak uvolnění virionů z buňky (Okada et al., 2005; Sariyer et al., 2011; Suzuki et al., 2010).

2.1.6. Strukturní proteiny MPyV a BKV a jejich interakce s buněčnými proteiny

Vzhledem k malé velikosti genomu polyomavirů a omezenému počtu proteinů, které kódují, využívají tyto viry pro svou replikaci velké množství buněčných proteinů. Mezi nimi jsou buněčné proteiny zahrnuté v transportu, transkripci DNA, translaci proteinů, replikaci DNA, regulaci buněčného cyklu a dalších procesech. Strukturní proteiny polyomavirů jsou

zodpovědné za první interakci s buněčným povrchem, za internalizaci virové částice buňkou a za úspěšný průběh dalších procesů a interakcí s buněčnými strukturami popsaných v předchozích kapitolách, které jsou nutné pro dopravení virové částice do jádra. V jádře se pak podílejí na regulaci transkripce a replikace virové DNA a morfogenezi virionů. Po úspěšném složení virionů v jádře buňky se účastní i uvolnění těchto virionů z buňky do vnějšího prostředí. Ne všechny mechanismy a procesy probíhající v replikačním cyklu polyomavirů jsou k dnešnímu dni plně prozkoumány a pochopeny. V této kapitole se zaměříme pouze na viry MPyV a BKV, kterými se tato práce zabývá.

Receptorovými proteiny ze skupiny gangliosidových receptorů, s nimiž interagují smyčky centrální oblasti VP1 viru MPyV, jsou molekuly GD1a, GD1b a GT1b. GD1a, na rozdíl od zbylých dvou gangliosidů, nezprostředkovává vazbu či internalizaci virové partikule, ale zajišťuje cílení váčků s viriony do ER (Qian et al., 2009; Tsai et al., 2003). BKV VP1 pak rozpoznává molekuly GD1b, GT1b, GD2 a GD3 (Low et al., 2006; Neu et al., 2013). Pro MPyV byla dále prokázána interakce s $\alpha 4\beta 1$ integriny a pro BKV s $\alpha(2,3)$ -sialovanými N-glykosylovanými glykoproteiny (Caruso et al., 2003; Dugan et al., 2005). Po interakci virionů s buněčnými receptory následuje internalizace virionů MPyV a BKV a transport ve váčcích do ER.

V endoplazmatickém retikulu, kde probíhá rozvolnění kapsid, interagují MPyV a BKV s celou řadou proteinů. MPyV VP1 interaguje v lumen ER s ERp29, což je chaperonům podobný protein ze skupiny protein-disulfid-izomeráz. Interakce CTD ERp29 s VP1 způsobuje dislokaci CTD VP1 a vystavení hydrofóbních domén minoritních proteinů na povrch virové částice (Magnuson et al., 2005; Rainey-Barger et al., 2009). Odhalení těchto hydrofóbních částí je nezbytné pro pozdější vazbu a inzerci virionu do membrány ER (Huérffano et al., 2017). Aby však byla taková změna konformace VP1 možná, je nutné přerušit stabilizující disulfidické vazby, které mezi sebou VP1 vytváří. ERp29 proto funguje v součinnosti s dalšími proteiny ze skupiny protein-disulfid-izomeráz, PDI a ERp57 (Walczak & Tsai, 2011). Na rozdíl od ERp29 obsahuje protein PDI katalyzační doménu, takže lze předpokládat její funkci v aktivní přestavbě disulfidických vazeb mezi VP1 proteiny (Gilbert et al., 2006). Jelikož u hydrofóbních rozvolněných částic hrozí agregace, váže se na odhalené domény minoritních proteinů chaperon BiP, který disociuje poté, co je částice dopravena k membráně ER (Bennett et al., 2013). Pro transport z ER do cytoplazmy a ustavení infekce je pro MPyV důležitý protein Derlin-2 a pro BKV Derlin-1, který s virovou částicí interaguje (Jiang et al., 2009; Lilley et al., 2006). Konkrétní funkce Derlin proteinů však zatím zůstává neznámá. Je možné, že pro penetraci membrány ER do cytoplazmy rekrutují oba viry prostřednictvím indukovaných membránových foci protein SGTA a cytosolický chaperon

Hsc70, se kterými posléze i přímo interagují tak, jak to bylo prokázáno u SV40 (Ravindran et al., 2015; Walczak et al., 2014).

Po transportu skrze membránu ER putují viriony na základě NLS strukturních proteinů do jádra a asociovaný Hsc70 pravděpodobně viriony chrání před degradací v cytoplazmě. Schopnost virů MPyV i BKV vstupovat do jádra je významně narušena mutacemi v NLS jak hlavního, tak minoritních kapsidových proteinů. Oba viry vstupují do jádra pomocí $\alpha/\beta 1$ importinové dráhy a právě NLS strukturních proteinů interagují s importinem β (Bennett et al., 2015; Soldatova et al., 2018).

V jádře byla prokázána interakce VP1 s poly(ADP-ribóza) polymerázou 1 (PARP-1). VP1 *in vitro* stimuluje aktivitu PARP-1 a *in vivo* PARP-1 pravděpodobně odstraňuje VP1 z virové DNA, aby bylo možné zahájit transkripci časných proteinů (Carbone et al., 2006). K regulaci transkripce pak pravděpodobně přispívá i multifunkční transkripční faktor YY1, s nímž VP1 v jádře také interaguje (Palková et al., 2000).

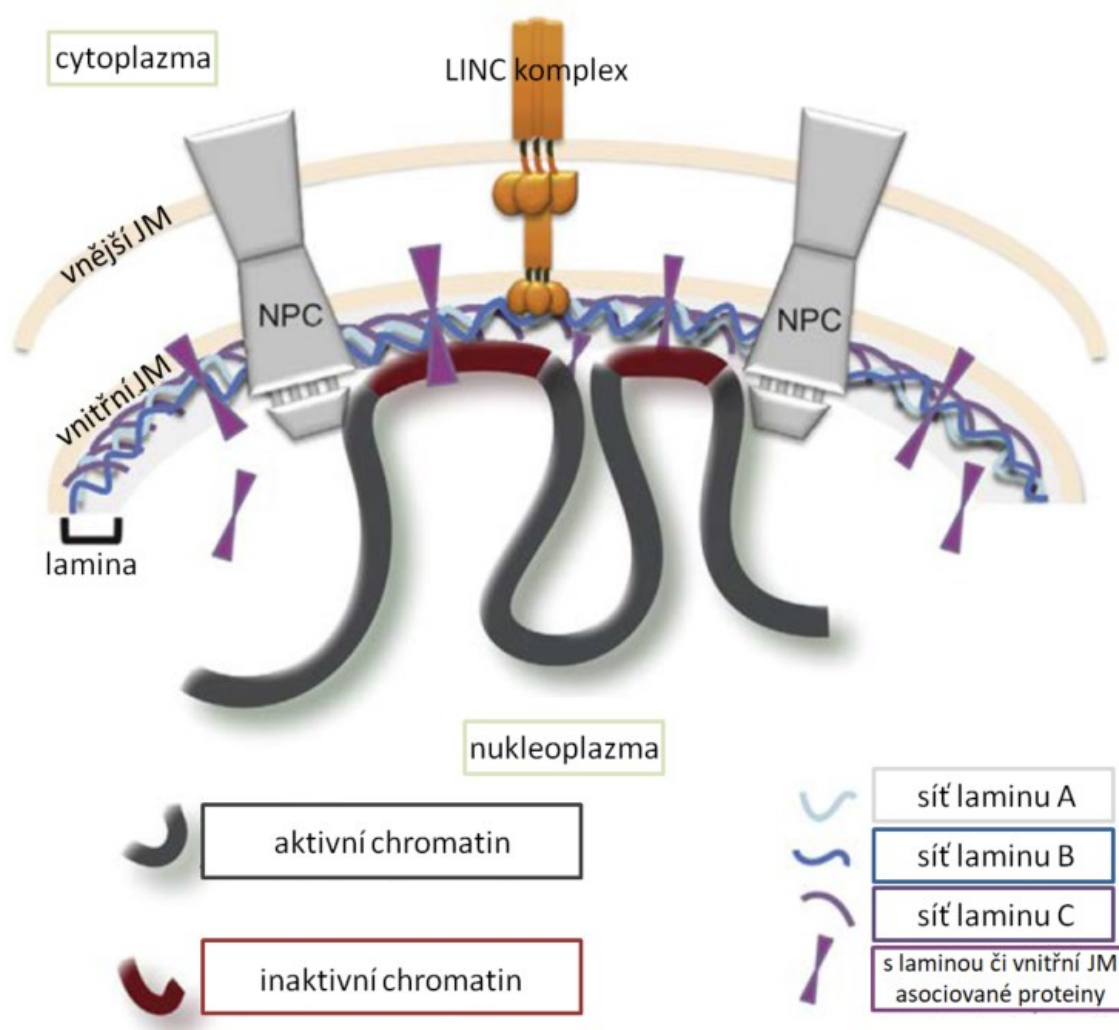
V pozdní fázi infekce jsou translatované kapsidové proteiny transportovány do jádra na základě NLS. Při infekci BKV pro tento proces nejsou důležité NLS minoritních proteinů VP2/VP3, ale pouze NLS hlavního VP1 (Bennett et al., 2015). Strukturní proteiny MPyV procházejí jaderným pórem v komplexu molekuly chaperonu Hsc70, pentameru VP1 a molekuly VP2 nebo VP3 (Forstová et al., 1993; Montross et al., 1991; Soldatova et al., 2018). Usuzuje se, že vazba Hsc70 brání předčasnému skládání virových kapsid v cytoplazmě. Tento chaperon zůstává s virovými proteiny asociovan i v jádře a podílí se na skládání virových kapsid. Bylo prokázáno, že zajišťuje invazi CTD proteinu VP1 do sousední kapsomery a je možné, že vyvazuje i nesprávně složené kapsidové proteiny, aby nebránily efektivní morfogenezi virionů. Každopádně Hsc70 nenacházíme v polyomavirových kapsidách, tudíž disociuje z komplexu s kapsidovými proteiny před, a nebo během enkapsidace virové DNA (Chromy et al., 2003; Cripe et al., 1995).

Určitá část VP1 není transportována do jádra a zůstává v cytoplazmě. Zde VP1 interaguje s mikrotubuly, čímž je stabilizuje. Rozbití mikrotubulární sítě nokodazolem inhibuje uvolnění virového potomstva z buněk, což vypovídá o důležitosti role mikrotubulů ve virové infekci (Horníková et al., 2017; Sanjuan et al., 2003).

2.2. Jaderná lamina

Obal jádra mnohobuněčných organismů sestává z vnější a vnitřní jaderné membrány, proteinových komplexů jaderných pórů (NPC) a jaderné laminy (obr. 9). Jaderná lamina byla poprvé popsána jako vláknitá proteinová síť nacházející se pod vnitřní jadernou membránou (Fawcett, 1966; Pappas, 1956). Ačkoli byla zprvu považována pouze za ochrannou bariéru

pro genetickou informaci v buňce, v současné době je již známo mnoho dalších procesů a funkcí, kterých se účastní a které zastává. Spolu s asociovanými proteiny se podílí na organizaci chromatinu (Solovei et al., 2013) a vzhledem k tomu, že oblasti chromozomální DNA asociované s laminou obsahují převážně netranskribované či pouze slabě exprimované geny (obr. 9), funguje pravděpodobně i jako transkripční represor v regulaci transkripce (Guelen et al., 2008). V souhře s dalšími proteiny hraje roli i v regulaci buněčného cyklu (Dechat et al., 2007), apoptóze (Rao et al., 1996), buněčné signalizaci a diferenciaci buněk (Huber et al., 2009).



Obr. 9 Organizace jaderného obalu a interakce laminy s okolními strukturami. Znázornění umístění a organizace laminy pod jadernou membránou (JM). Naznačeny jsou protein-proteinové interakce laminy s LINC komplexy a proteiny komplexů jaderných pórů (NPC) a interakce laminy s laminou asociovanými oblastmi na chromozomální DNA. Upraveno podle Gaillard & Reddy, 2018.

Vedle regulačních funkcí má přirozeně zcela zásadní funkce mechanické. Podílí se na ukotvení jaderných pórů a propojení nukleoplazmatického prostředí s cytoplazmou (Aaronson & Blobel, 1975). Zároveň zprostředkovává kontakt nukleoplazmatického prostředí s cytoplazmatickým cytoskeletem. Tento kontakt umožňují proteiny LINC komplexů

asociované s laminou a prostupujících skrze vnitřní a vnější jadernou membránu do cytoplazmy (obr. 9) (Horn, 2014). Jaderná lamina skrze toto propojení ovlivňuje organizaci cytoskeletu, polarizaci, adhezi a migraci buněk (Corne et al., 2017; Lee et al., 2007; Van Loosdregt et al., 2017). Zároveň zastává důležitou roli v reakcích buňky na mechanické podněty z extracelulárního prostředí a převádění těchto podnětů do vnitřní organizace buňky (Cho et al., 2019). Je tak cílovou strukturou, která zajišťuje migraci a umístění jádra v buňce prostřednictvím cytoskeletální indukované extracelulárními i intracelulárními podněty (Gant Luxton et al., 2011; Houben et al., 2009).

Ačkoli lamina zastává mnoho výše zmíněných funkcí, její klíčová role stále spočívá především v mechanické podpoře jádra (Lammerding et al., 2004). Jedná se přitom nejen o mechanickou odolnost a udržení tvaru jádra, ale i o udržení integrity jádra a buňky (Broers et al., 2004; Cho et al., 2019). Jaderná lamina spolu s dalšími asociovanými proteiny během mitózy a dělení buněk depolymeruje a po rozdělení buňky se podílí na opětovném složení jaderného obalu (Champion et al., 2017; Gerace et al., 1978). Zúčastněné proteiny jsou během těchto procesů přísně regulovány a odchylky v jejich funkci mohou mít pro buňku a organismus fatální následky.

2.2.1. Jaderné laminy

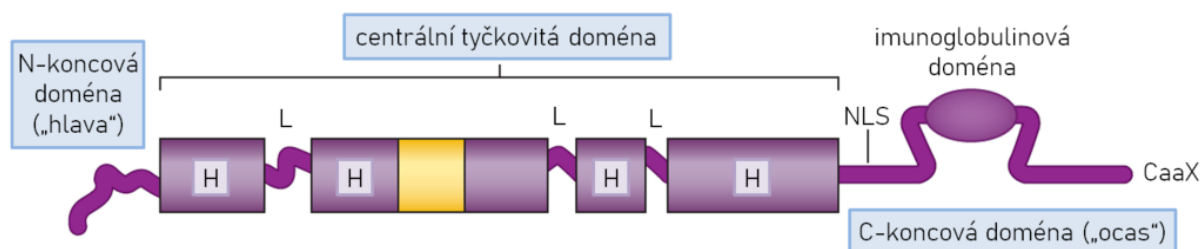
Jaderná lamina je síťovitá struktura tvořená laminy typu A a B a s laminy asociovanými proteiny (Gruenbaum & Foisner, 2015). Evolučně původním typem laminů jsou laminy typu B (Stick, 1992). Všechny savčí buňky exprimují alespoň jeden lamin typu B, zatímco laminy typu A jsou exprimovány hlavně v diferenciovaných buňkách a pouze u obratlovců (Gruenbaum & Foisner, 2015; Lehner et al., 1987; Rober et al., 1989).

Laminy se řadí do skupiny intermediárních mikrofilament (InF) (Fisher et al., 1986). Jako všechny další InF jsou tvořeny krátkou N-terminální doménou („hlava“), centrální tyčkovitou doménou složenou ze čtyř α -helixů oddělených proteinovými linkery a globulární C-terminální doménou („ocas“). CTD obsahuje NLS, imunoglobulinovou doménu a koncový *CaaX* motiv (C – cystein; a – alifatická aminokyselina; X – jakákoli aminokyselina) (obr. 10) (Gruenbaum & Foisner, 2015).

V savčích buňkách jsou laminy kódovány třemi geny; *LMNA*, *LMNB1* a *LMNB2*. Tyto geny kódují čtyři majoritní a tři minoritní izoformy laminů. Gen *LMNA* kóduje laminy typu A, mezi něž patří majoritní izoformy lamin A a lamin C a minoritní izoformy A Δ 10 (exprimován pouze v zárodečných buňkách) a C2. Gen *LMNB1* kóduje lamin B1, majoritní izoformu laminu typu B. Zbývající majoritní a minoritní izoformy laminů typu B, lamin B2 a

lamin B3 (exprimován pouze v zárodečných buňkách), jsou kódovány genem *LMNB2* (Stiekema et al., 2020).

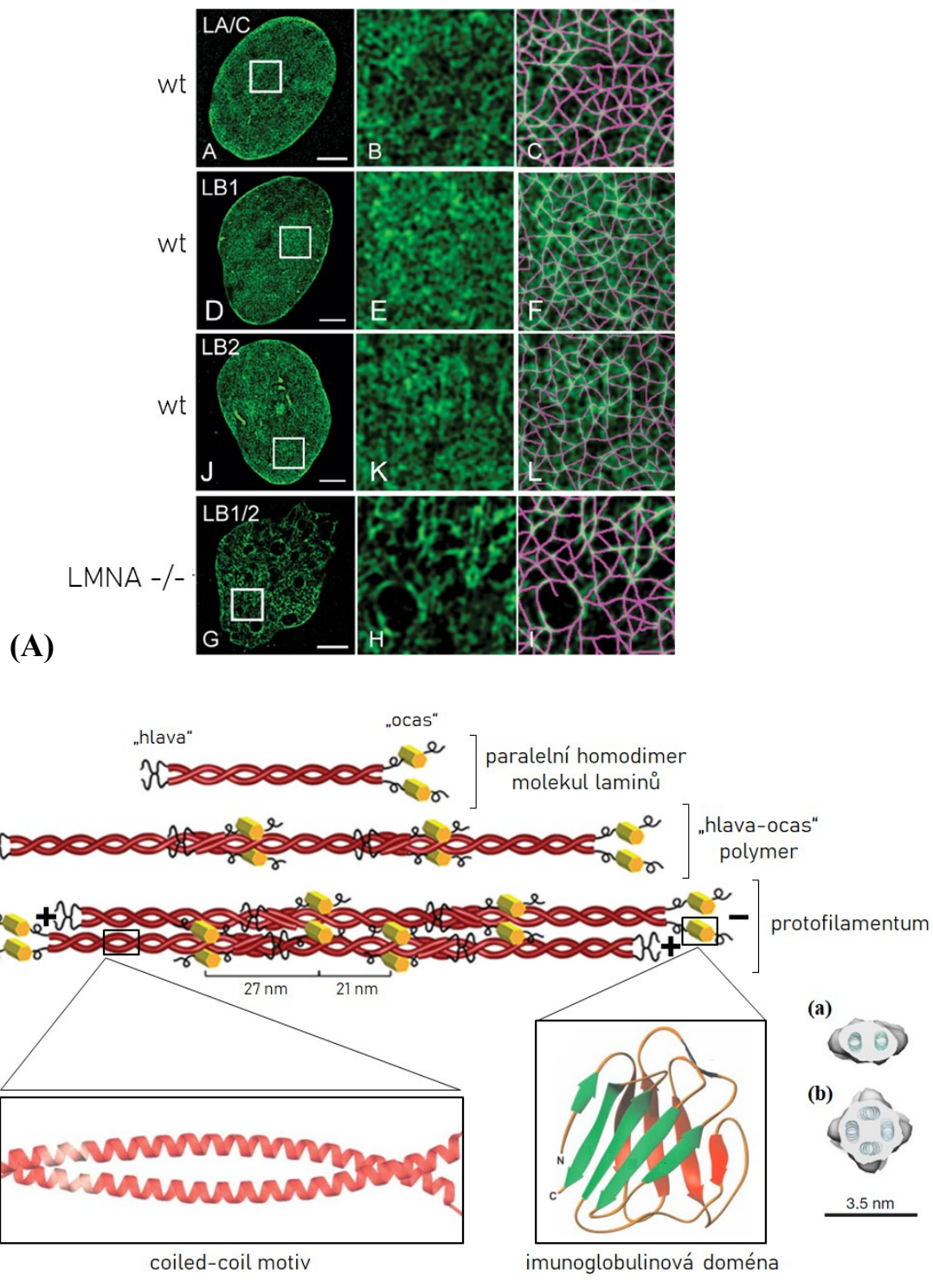
Lamin A a lamin C jsou různě sestřižené produkty jednoho genu. Oba proteiny sdílí prvních 566 aminokyselin z N-konce a liší se svými C-konci. Lamin A je tvořen 646 aminokyselinami a na jeho C-konci se nachází *CaaX* motiv. Lamin C je kratší formou proteinu z 572 aminokyselin a *CaaX* motiv neobsahuje (Sylvius et al., 2008).



Obr. 10 Schématické znázornění stavby molekuly laminu. Laminy mají shodnou stavbu jako ostatní InF. Jsou tvořeny N-koncovou doménou představující „hlavu“ proteinu, centrální tyčkovitou doménou složenou z helixů (H) propojených proteinovými linkery (L) a C-koncovou doménou obsahující jaderný lokalizační signál (NLS), imunoglobulinový motiv a terminální *CaaX* motiv. **Žlutě** je označen motiv šesti opakovaní sedmi aminokyselin, který odlišuje laminy od cytoplazmatických intermediárních filament. Upraveno podle Gruenbaum & Foisner, 2015.

Každá z izoforem laminů vytváří oddělené sítě, které dohromady tvoří strukturu jaderné laminy o tloušťce přibližně 14 nm. Při mapování laminových sítí v buňkách se ukázalo, že velikost „průsvitů“ sítí z laminu B1 i laminu B2 je shodná a že mezi laminy typu B a laminy A/C existuje jen nepatrný rozdíl. Nicméně v buňkách se deletovaným genem pro lamin A vykazovala síť laminů typu B významné morfologické změny a „průsvity“ laminové sítě byly podstatně zvětšené oproti normálním buňkám (obr. 11 A) (Shimia et al., 2015).

Pro vytvoření sítě interagují paralelní homodimery laminů prostřednictvím coiled-coil motivu v orientaci „hlava-ocas“ a vytváří tak vlákno polymeru (Kolb et al., 2011). Vlákno polymeru následně interaguje antiparalelně s dalším vláknem polymeru za vzniku protofilament (Turgay et al., 2017). Imunoglobulinová doména se na protofilamentech nachází v 10 nm až 20 nm rozestupech, což je způsobeno posuvem vláken vůči sobě při antiparalelním skládání (obr. 11 B) (Turgay & Medalia, 2017). V porovnání s mikrotubuly (průměr 24 nm) a dalšími filamenty, jako aktin (průměr 8nm) či cytoplazmatická intermediární filamenta (10 nm), jsou laminy s průměrem protofilament 3,5 nm těmi nejtenčími z nich (de Leeuw et al., 2018).



Obr. 11 Skládání laminů do vyšších struktur. (A) Mapování sítí laminů. U normálních buněk (**wt**) jsou „průzory“ sítí tvořených laminy typu B mnohem menší, než v buňkách s deletovaným genem pro lamin A (**LMNA -/-**). Upraveno podle Shimia et al., 2015. (B) Zobrazení skládání molekul laminů do homodimerů, „hlava-ocas“ polymerů a antiparalelních tetramerů neboli protofilament tvořících laminovou síť. Vyznačeny jsou vzdálenosti mezi globulárními imunoglobulinovými motivy způsobené posuvem antiparalelních vláken vůči sobě navzájem. **Žlutě** imunoglobulinový motiv. V detailu je zobrazen coiled-coil motiv tvořený mezi helixy centrální domény monomerů laminů propojených v dimeru. V pravé části obrázku (a) průřez dimerem a (b) protofilamentem tvořeným laminy. Převzato a upraveno podle Dhe-Paganon et al., 2002; Gruenbaum & Foisner, 2015; Strelkov et al., 2004; Turgay et al., 2017.

Jaderné laminy jsou různými způsoby posttranslačně modifikovány. Významnou modifikací je farnesylace cysteinu v *CaaX* motivu na C-konci laminu A a laminů typu B. U laminů typů B je po farnesylosti odštěpena sekvence *aaX* a C-terminální cystein je navíc metylován (Rusiñol & Sinensky, 2006). Laminy typu B již zůstávají permanentně farnesylovány a asociují s membránou (Nigg et al., 1992). Lamin A je také posttranslačně farnesylován v motivu *CaaX*, ale po inkorporaci do membrány je dále procesován, přičemž je odštěpeno 15 aminokyselin z C-konce proteinu, tedy včetně farnesylovaného cysteinu (Weber et al., 1989). C-terminální aminokyselinou se poté stává tyrosin. Ačkoli je farnesylace cysteinu esenciální pro lokalizaci laminů typu B v periferních oblastech jádra, lamin A ani lamin C tuto modifikaci neobsahují a pro lokalizaci pod JM ji nevyžadují (Adam et al., 2013; Dittmer & Misteli, 2011). Od přítomnosti či nepřítomnosti hydrofóbní farnesylové skupiny se také odvíjí některé rozdíly v biochemických vlastnostech laminů typu A a B. Zatímco laminy typu A nacházíme i v rozpustné formě v nukleoplasmě (Kolb et al., 2011), laminy typu B jsou za běžných okolností díky farnesylosti nerozpustné. Během časných fází mitózy jsou laminy spolu s dalšími jadernými proteiny a proteiny NPC fosforylovány a stávají se tak rozpustnými. Po segregaci chromatid a defosforylaci laminy typu B rychle polymerují, snižuje se jejich mobilita a asociují díky své hydrofóbní doméně s dalšími složkami jaderného obalu na povrchu kondenzovaných chromozomů. Oproti tomu laminy typu A jsou v telofázi stále z většiny rozpustné a s jádrem začínají asociovat až v poměrně pokročilé fázi skládání jaderného obalu. Až do časně G1 fáze prostupují nukleoplasmou v neopolymerovaném stavu (Broers et al., 1999; Moir et al., 2000; Stiekema et al., 2020).

Laminy obsahují mnoho konzervovaných fosforylačních míst (v sekvenci laminů typu A je jich popsáno více než 30) a jsou fosforylovány různými buněčnými kinázami, které modulují jejich funkce, lokalizaci, rozpustnost či schopnost polymerovat (Collas et al., 1997; Dittmer & Misteli, 2011; Eggert et al., 1991). Kromě farnesylosti a fosforylosti byla ještě popsána sumoylace laminů typu A, která je důležitá jak v procesech nutných pro sestavení jaderného obalu po mitóze, tak pro správnou subcelulární lokalizaci laminů (Moriuchi et al., 2016; Zhang & Sarge, 2008).

Laminární proteiny jednotlivých typů jsou schopny vzájemně částečně kompenzovat nepřítomnost některého typu laminu v buňce a buňky jsou tak životaschopné. V případě absence některého laminu však jádra vykazují různé morfologické aberace, které se liší v závislosti na chybějícím typu laminů. Ukazuje se, že laminy A/C poskytují jádru převážně mechanickou podporu, napomáhají udržení tvaru jádra a jeho odolnosti vůči tlaku. Laminy typu B se více podílí na udržení integrity jádra a nepřítomnost některého izomeru způsobuje

tvorbu „blebů“. Jejich nepřítomnost však nemá vliv na „tuhost“ a mechanickou odolnost jádra, ani na tvar jaderné laminy (Lammerding et al., 2006).

2.3. Viry a jaderná lamina

Replikace většiny virů s DNA genomem probíhá v jádře. Některé viry využívají pro překonávání jaderného obalu jaderné póry, kterými vstupuje či opouští jádro celý virion či virová DNA. Některé viry si však kvůli příliš velké velikosti virionů či z jiných důvodů musely osvojit i jiné způsoby překonání této bariéry. Jaderný cytoskelet ve formě jaderné laminy v těchto případech představuje zásadní překážku. Tato kapitola se věnuje čeledi DNA virů napadajících obratlovce, které v některé fázi replikačního cyklu interagují s jadernou laminou.

2.3.1. Herpesviry

Herpesviry jsou velké obalené viry s genomem tvořeným dvojvláknovou DNA. Vstup virového genomu do jádra probíhá jaderným pórem, přičemž velké virové kapsidy zůstávají v cytoplazmě. Herpesviry však musely najít způsob, jak překonat bariéru jaderného obalu a umožnit transport virových částic do cytoplazmy v pozdní fázi infekce. Kvůli své velikosti nejsou viriony schopny opustit jádro, ve kterém probíhá virová replikace a morfogeneze virionů, jaderným pórem. Proto herpesviry kódují transmembránové proteiny, které zajistí rozrušení jaderné laminy. U Herpes simplex viru 1 (HSV-1) tuto funkci plní proteiny UL31 a UL34, které rozvolňují síť laminu B síť a laminu A/C a umožňují tak vazbu virových partikul k vnitřní JM (Reynolds et al., 2004). Homologní proteiny se stejnou funkcí byly popsány i u Herpes simplex viru 2 (HSV-2), prasečího Herpesviru 1 (SHV-1), lidského cytomegaloviru (HCMV), myšího cytomegaloviru (MCMV) a viru Epstein-Barrové (EBV) (Cibulka et al., 2012). Vazbou k vnitřní JM a následným vypučením do perinukleárního prostoru získávají viriony přechodně obal z vnitřní jaderné membrány, který následně fúzuje s vnější JM a neobalené viriony se dostávají do cytoplazmy (Reynolds et al., 2001). U viru HSV-1 byla prokázána fosforylace laminu A/C virovou serin/threoninovou kinázou US3 a bylo pozorováno zvýšení rozpustnosti laminu A/C a jeho částečná relokalizace do nukleoplazmy (Mou et al., 2007; Reynolds et al., 2004). U viru HCMV pak virové kinázy pravděpodobně zajišťují fosforylaci buněčné peptidyl-prolyl izomérazy Pin1, která je následně zodpovědná za disrupci sítě laminu A/C (Milbradt et al., 2010; 2016). Všechna tato pozorování odhalují množství přímých či nepřímých proteinových interakcí virových proteinů s jadernou laminou a vedou k úvahám ohledně potenciální existence podobných interakcí i u jiných virových čeledí.

2.3.2. Parvoviry

Parvoviry jsou malé neobalené viry s jednovláknovou DNA. Ačkoliv díky své velikosti mohou do jádra vnikat jaderným pórem na základě NLS (Nicolson & Samulski, 2014), vstupují do jádra i bez využití jaderných pórů, tedy skrze jadernou membránu. Minute virus of mice (MVM) využívá hostitelskou kaspázu 3, obvykle štěpící proteiny jaderného obalu a laminy během apoptózy. Imunofluorescenční analýzy potvrdily změny morfologie jádra a rozrušení jaderného obalu během časných fází infekce (Cohen et al., 2006). Zároveň inhibice kaspázy 3 zcela inhibuje vstup virionů do jádra (Cohen et al., 2011). MVM využívá k i hostitelské kinázy jako PKC a Cdk-2, které fosforylují a hyperfosforylují laminy a způsobují tak jejich depolymeraci (Porwal et al., 2013). Vstup bez využití jaderných pórů byl prokázán i u adeno-asociovaného viru 2 (AAV2) (Hansen et al., 2001).

Zdá se, že parvoviry opouští jádro před lyzí buňky jaderným pórem na základě jaderného exportního signálu (NES) přítomného na povrchu virionů (Engelsma et al., 2008). Viriony psího parvoviru (CPV) se v pozdní fázi infekce shromažďují v oblastech na periferii jádra se zvýšenou akumulací proteinů NPC a laminu B a velmi defektním barvením laminu A/C. To může poukazovat jak na využití jaderných pórů pro export virionů z jádra, tak na překonávání jaderného obalu fyzickým rozrušením laminy. Jednoznačně však v infikovaných buňkách dochází k virem indukované reorganizaci jaderné laminy (Mäntylä et al., 2015). Potenciální alternativní export virionů z jádra nezávislý na jaderném póru však nebyl zatím potvrzen.

2.3.3. Polyomaviry

Genomy polyomavirů vstupují do jádra jaderným pórem. V nedělicích se buňkách infikovaných SV40 však bylo v časných fázích infekce (6 hodin po infekci, hpi) pozorováno přechodné snížení hladiny laminu A/C. Tato změna korelovala i s morfologickými změnami jádra. Zároveň byla v časných fázích infekce (6 hpi) pozorována i akumulace laminu A v cytoplazmě (Butin-Israeli et al., 2011). Na základě těchto pozorování byla navržena alternativní cesta vstupu virionů do jádra než prostřednictvím jaderného póru, a to skrze jadernou membránu se současným rozrušením jaderné laminy. Tato hypotéza však nebyla zatím nijak potvrzena.

3. Cíle práce

Myší polyomavirus

Myší polyomavirus je významným modelovým polyomavirem, kterému se naše laboratoř dlouhodobě věnuje. V této práci jsme se zaměřili na interakce virových strukturních proteinů se strukturou jaderné laminy. Cílem práce bylo objasnit kdy, za jakých okolností a jakým způsobem virus, potažmo virové strukturní proteiny, s jadernou laminou interagují a jak tyto interakce ovlivňují vlastnosti jaderné laminy. Konkrétními cíli práce bylo:

- **nalézt takový expresní vektor, který po transfekci zajistí stejnou lokalizaci proteinu VP1, jakou můžeme pozorovat v infikovaných buňkách v pozdní fázi infekce**
- **určit množství proteinu VP1 v buněčných kompartmentech u buněk po infekci a po transfekci**
- **otestovat, jestli má exprese strukturních proteinů vliv na množství laminu A/C a laminu B1 v buňce**
- **ověřit vliv exprese strukturních proteinů na rozpustnost laminu A/C v buňce**
- **porovnat lokalizaci proteinu VP1 v buňkách s deletovaným genem pro lamin A s buňkami tento protein exprimujícími**

BK virus

Ačkoli je MPyV široce využívaným modelovým polyomavirem, ne všechny aspekty jeho replikace jsou shodné s jejím průběhem u dalších polyomavirů. Proto je nutné provádět výzkum současně i na lidských polyomavirech, které způsobují mnohdy závažné zdravotní komplikace u imunosuprimovaných jedinců. Pro účely dalšího výzkumu v naší laboratoři bylo cílem této práce optimalizovat metody pro práci s virem BKV, respektive vektory nesoucími BK virové proteiny. Konkrétními cíli bylo:

- **optimalizovat metodu transfekce savčích buněk RPTEC/hTERT1 nukleofekcí**
- **určit lokalizaci proteinu VP1 v buňkách transientně exprimujících protein VP1 nebo ko-exprimujících VP1 a VP2 a porovnat jejich lokalizaci s lokalizací v infikovaných buňkách**

- **zkonstruovat expresní vektor pEF-BKV-LATE obsahující celou pozdní oblast genomu BKV Dunlop2 strain**
- **ověřit expresi proteinu VP1 z plazmidu pEF-BKV-LATE**

4. Materiál a metody

4.2. Práce s DNA

4.2.1. Vektory

pVP1 BKV	Vektor pro expresi proteinu VP1 BK viru v savčích buňkách. Gen pro protein VP1 je vložen pod kontrolu silného eukaryotického promotoru E1a, zároveň byly kodony genu pro protein VP1 modifikovány pro expresi proteinu v savčích buňkách (Mrkáček, 2018).
pwB2b	Vektor pro současnou expresi proteinů VP1 a VP2 BK viru v savčích buňkách (Schowalter et al., 2011).
pBKV (34-2)	Plazmid obsahující genom BKV (Dunlop2 strain) (ATCC; 45025). Plazmidová kostra vložena mezi restrikčními místy pro BamHI v kódující sekvenci pro VP1.
pENTR™/D-TOPO®	Donorový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace. Obsahuje attL1 a attL2 místa, která umožňují klonování genu našeho zájmu do cílového vektoru pomocí rekombinace. Gen našeho zájmu je do vektoru vložen přímým klonováním za pomoci topoizomerázy. (Thermo Fisher Scientific).
pEF-DEST 51	Akceptorový vektor pro klonování pomocí LR rekombinace <i>in vitro</i> . Obsahuje attR1 a attR2 místa, která umožňují vložení genu našeho zájmu z donorového vektoru pomocí rekombinace. Vložený gen je pod kontrolou silného eukaryotického promotoru E1a. (Thermo Fisher Scientific).
pVP1	Vektor pro expresi proteinu VP1 myšího polyomaviru v savčích buňkách. Gen pro protein VP1 je vložen pod kontrolu silného eukaryotického promotoru E1a, zároveň byly kodony genu pro protein VP1 modifikovány pro expresi proteinu v savčích buňkách (Horníková et al., 2011).
pVP2	Vektor pro expresi proteinu VP2 myšího polyomaviru v savčích buňkách. Gen pro protein VP2 je vložen pod kontrolu silného eukaryotického promotoru E1a, zároveň byly kodony genu pro

protein VP2 modifikovaný pro expresi proteinu v savčích buňkách (Huerfano et al., 2013).

pMPyV LATE Vektor pro expresi strukturních proteinů MPyV v savčích buňkách. Vektor obsahuje sekvenci pozdní oblasti genomu myšího polyomaviru v plazmidu pEF1/myc-His vector a umožňujícího expresi pozdních genů pod kontrolou eukaryotického promotoru EF1 (Váňová et al., 2020).

pMPyV mut3 VP1 Vektor pro expresi proteinu VP1 myšího polyomaviru, který obsahuje mutace v oblasti NLS (K6Q-S7R-G8R) (Soldatova et al., 2018).

4.2.2. Komerční soupravy používané při práci s DNA a vektory

Kity pro izolaci DNA

- **Nucleobond Xtra Midi (Macherey-Nagel):** pro izolace plazmidové DNA pro následnou transfekci savčích buněk
- **GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich):** pro izolace DNA pro sekvenace, LR rekombinaci nebo restriční štěpení

Kity pro purifikaci DNA

- **High Pure Purification Kit (Roche):** pro přečištění DNA po PCR reakci nebo restričním štěpení

Kity pro klonování

- **pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific):** pro vkládání inzertů přímým klonováním pomocí topoizomerázy
- **Gateway™ LR Clonase™ II enzyme mix (Thermo Fisher Scientific):** pro *in vitro* LR rekombinaci mezi attL a attR místy vektorů

4.2.3. Izolace plazmidové DNA

Bakterie obsahující požadovaný vektor byly inkubovány 16-20 h v požadovaném objemu (10 – 100 ml) v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 rpm. Druhý den byly bakterie peletovány centrifugací při 4000 g po dobu 7 minut. Poté byl pelet resuspendován a dále zpracován dle protokolu komerční soupravy Nucleobond Xtra Midi (Macherey-Nagel) nebo GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

4.2.4. Restrikční štěpení DNA

Štěpení DNA bylo prováděno v objemu 20-100 μ l. Reakce obsahovala DNA, restrikční enzym (či dva restrikční enzymy najednou), odpovídající pufr, 1/10 objemu RNázy a ddH₂O pro doplnění na požadovaný objem reakce. Restrikční štěpení poté probíhalo 3-16 h v termostatu při 37 °C. Restrikční směs byla přečištěna soupravou High Pure Purification Kit (Roche) nebo byly vzorky přímoanalyzovány na elektroforéze.

4.2.5. Ligace genomu BK viru (self-cirkularizace lineární DNA)

Štěpený plazmid pBKV (100 ng) byl smíchán s 10 μ l reakčního pufru (10 x koncentrovaný ligační pufr; Thermo Fisher Scientific) a 10 U T4 DNA ligázy (Thermo Fisher Scientific). Objem reakce byl doplněn H₂O do celkového objemu 100 μ l. Ligační směs byla inkubována 16-20 h při 22°C. Ligovaná DNA byla přečištěna a koncentrována srážením.

4.2.6. Srážení DNA

Ligovaná DNA byla srážena přidáním 0,1 násobku objemu 3 M octanu sodného (pH = 5,2) a 2,5 násobku objemu 96% etanolu. DNA byla srážena 16-20 h při -20°C. Vzorky obsahující DNA byly centrifugovány 30 min při 4 °C a 20 000 g. Po odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 200 μ l 70 % EtOH a směs byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace 20 min při 4 °C a 20 000 g. Supernatant byl odstraněn a po vyschnutí byla DNA rozpuštěna ve 20 μ l ddH₂O a skladována při teplotě -20 °C.

4.2.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci DNA fragmentu obsahujícího pozdní oblast genomu BKV byla použita Phusion High-Fidelity DNA polymeráza (New England Biolabs). Výsledkem byly fragmenty DNA s tupými konci vhodné pro klonování pomocí topoizomerázy. V PCR směsi pro jednu reakci bylo obsaženo:

primer forward (10 μ M)	1,25 μ l
primer reverse (10 μ M)	1,25 μ l
templátová DNA	1,25 μ l koncentrované ligační směsi (přibližně 5 ng DNA)
2 x Phusion Master Mix	12,5 μ l
ddH ₂ O	doplněno do 25 μ l

Směs byla připravována na ledu. Prvotní denaturace DNA probíhala 30 s při 98 °C. Následovalo 30 cyklů denaturace DNA (10 s; 98 °C), nasedání primerů (30 s, 54 °C) a polymerace DNA (90 s, 72 °C). Finální polymerace probíhala po dobu 10 min při 72 °C

DNA primery

Sekvence jsou uvedeny ve směru od 5' konce k 3' konci.

- Primer „forward“ pro amplifikaci pozdní oblasti genomu BKV (Dunlop strain)

Sekvence: caccGAAAGTGCATGACAGAC

Malými písmeny jsou uvedeny nekomplementární sekvence potřebné pro TOPO klonování.

- Primer „reverse“ pro amplifikaci pozdní oblasti genomu BKV (Dunlop strain)

Sekvence: TAACACAAGCTTAAAAGTG

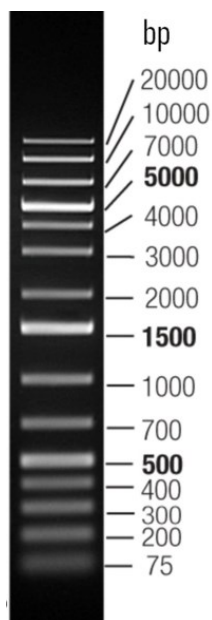
4.2.8. Minipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou

Do mikrozkušavek se 700 µl LB Broth média a selekčním antibiotikem byly zaočkovány bakteriální monokolonie, jež narostly na agarových plotnách se selekčním antibiotikem po transformaci. Bakterie byly inkubovány v mikrozkušavkách v orbitálním inkubátoru 16-20 h při 37 °C a 200 rpm. Bakteriální suspenze byla peletována 5 min, 4000 g při 4 °C. Pelet byl resuspendován v 250 µl Roztoku I (25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH = 8). Poté bylo k suspenzi přidáno 250 µl lyzačního Roztoku II (1% SDS (w/V); 0,2 M NaOH) a obsah zkumavky byl promíchán otáčením zkumavkou. Následovala inkubace 5 min při laboratorní teplotě a poté bylo přidáno 200 µl Roztoku III (3 M octan draselný; 11,5 % (V/V) kyselina octová). Obsah zkumavky byl opět promíchán otáčením zkumavkou a inkubován 10 min na ledu. Poté byla suspenze centrifugována 10 min při 4 °C a 20 000 g. K supernatantu bylo přidáno 500 µl izopropanolu a směs byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Následně byla vysrážená DNA peletována 20 min při 4 °C a 20 000 g. Pelet byl resuspendován v 70% etanolu (V/V) a znovu peletován centrifugací 20 min při 20 000 g a 18 °C. Peletovaná DNA byla vysušena při pokojové teplotě a rozpuštěna v 10-20 µl H₂O. Izolovaná DNA byla štěpena restrikcí endonukleázami (viz 4.2.4. Restrikcí štěpení DNA).

4.2.9. Horizontální agarózová DNA elektroforéza

Pro separaci a analýzu DNA vzorků byl používán 1% agarózový gel (w/V) v 0,5 x TBE pufru (45 mM Tris; 45 mM kyselina boritá; 1 mM EDTA-NaOH; pH 8). Pro vizualizaci DNA byla do gelu přidána barva GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, ředění 1:10 000). Vzorky DNA byly smíchány s nanášecí barvou 6 x DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific), tak aby výsledná koncentrace byla 1x. Pro určení velikosti DNA fragmentů byl

zároveň se vzorky nanesen marker molekulových vah GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) (obr. 12). Separace probíhala v 0,5 x TBE pufru při konstantním napětí 5V/cm. DNA byla následně vizualizována pod UV světlem v transluminátoru InGenius (Syngene).



Obr. 12 Marker molekulových vah GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (75-20 000 kb) (Thermo Fisher Scientific)

4.2.10. Sekvenace DNA

Veškeré sekvenace byly prováděny sekční Laboratoří Sekvenace DNA, Průmyslová 595, Vestec.

4.2.11. Stanovení koncentrace DNA

Stanovení koncentrace izolované DNA a kontrola jejího případného znečištění organickými či anorganickými sloučeninami byla prováděna přístrojem NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) dle návodu výrobce.

4.2.12. Plazmid pEF-BKV-LATE

Plazmid pEF-BKV-LATE byl připraven LR rekombinací donorového vektoru obsahujícího sekvenci pozdní oblasti genomu BK viru a cílového plazmidu pEF-DEST 51 (Thermo Fisher Scientific) dle instrukcí výrobce.

Amplifikovaný fragment byl pomocí komerční soupravy pro TOPO® klonování pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*

(Thermo Fisher Scientific) vložen *in vitro* do vektoru pENTR-D-TOPO dle instrukcí výrobce za vzniku donorového plazmidu pENTR-BKV-LATE.

Vytvořený plazmid pENTR-BKV-LATE byl použit jako donorový vektor v LR rekombinaci s cílovým vektorem pEF-DEST 51 za použití soupravy Gateway™ LR Clonase™ II enzyme mix (Thermo Fisher Scientific) dle instrukcí výrobce.

4.3. Práce s bakteriálními kulturami

4.3.1. Bakteriální kmeny

Bakteriální kmen *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific): F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*

4.3.2. Kultivační média

Tekutá média

LB Broth médium (Sigma-Aldrich): 1% (w/V) pepton; 0,5% (w/V) kvasničný autolyzát; 1% (w/V) NaCl

Low Salt LB Broth médium (Sigma-Aldrich): 1% (w/V) pepton; 0,5% (w/V) kvasničný autolyzát; 0,5% (w/V) NaCl

SOC médium: 2% (w/V) pepton (Imuna); 0,5% (w/V) kvasničný autolyzát (Imuna); 20 mM glukóza; 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄

Pevná média

LB Broth with agar (Sigma-Aldrich): 1,5% (w/V) agar; 1% (w/V) trypton; 0,5% (w/V) kvasničný autolyzát; 1% (w/V) NaCl

4.3.3. Použitá selekční antibiotika

Zeocin (Invivogen)	výsledná koncentrace 50 µg/ml pro pevná i tekutá média
Kanamycin (MP Biomedicals)	výsledná koncentrace 50 µg/ml
Chloramfenikol (Sigma-Aldrich)	výsledná koncentrace 20 µg/ml
Ampicilin (Biomedika)	výsledná koncentrace 100 µg/ml

4.3.4. Kultivace bakterií na pevném médiu

Pro kultivaci bakterií na pevných médiích bylo použito LB médium s přidavkem agaru (Sigma Aldrich) a příslušných antibiotik. Pro selekci bakterií pomocí zeocinu bylo použito low-salt LB médium rovněž s přidavkem agaru. Bakteriální suspenze byla nakapána do středu Petriho misky s pevným LB médiem a příslušnými antibiotiky a rozetřena po celém povrchu. Popřípadě byla část bakteriální biomasy z narostlé monokolonie přenesena sterilním párátkem na Petriho misku. Bakterie na agarových plotnách byly inkubovány v termostatu dnem vzhůru při 37 °C po dobu 16-20 h.

4.3.5. Kultivace bakterií v suspenzi

Z bakteriální konzervy bylo sterilním párátkem odebráno malé množství bakteriální kultury, a i s párátkem umístěno na dno Erlenmayerovy baňky s 5-100 ml kultivačního média. Bakterie byly kultivovány 16-20 h v orbitálním inkubátoru při 200 rpm a 37 °C.

4.3.6. Transformace bakterií elektroporací

Konzerva kompetentních bakterií byla rozmrazena na ledu a do nové vychlazené mikrozkuřavky bylo přeneseno 50 µl bakteriální suspenze. K těmto buňkám byl přidán 1 µl směsi roztoku DNA po LR rekombinaci a špičkou pipety byla suspenze promíchána. Bakteriální suspenze byla inkubována 1 min na ledu a poté přenesena do elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod 2 mm; Bio-Rad). Pečlivě osušená elektroporační kyveta byla následně umístěna do elektroporátoru Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad). Elektroporace byla provedena pulzem stejnosměrného proudu (2,5V, 25 µF, 200 Ω) trvajícího 4,5 - 5 ms. Po elektroporaci bylo přidáno 950 µl SOC média a buňky byly inkubovány 1 h v orbitálním inkubátoru při 37 °C a 200 rpm. Následně byly bakterie vysety na agarové plotny v různých ředěních a inkubovány při 37 °C po dobu 16-20 h hodin.

4.3.7. Transformace bakterií tepelným šokem

Kompetentní bakterie byly rozmrazeny na ledu. K bakteriím byly přidány 2 µl směsi DNA po TOPO reakci, směs byla opatrně promíchána špičkou a inkubována 5 minut na ledu. Poté byla mikrozkuřavka umístěna na 30 s do vodní lázně předehřáté na 42 °C. Ihned po vyjmutí z vodní lázně byla směs s bakteriemi znovu inkubována na ledu 5 min. Následně bylo přidáno 250 µl SOC média předehřátého na 37 °C a buněčná směs byla inkubována 1 h při 250 rpm a 37 °C. Poté byly bakterie vysety na agarové plotny se selekčním antibiotikem a inkubovány 16-20 h v termostatu při 37 °C.

4.3.8. Uchovávání bakterií

Bakteriální kultury byly dlouhodobě uchovávány v mikrozkuvkách při -80 °C smíchané se sterilním roztokem glycerolu do výsledné koncentrace 20-25 % (V/V). Pro krátkodobé skladování byly misky s agarem s narostlými koloniemi uloženy dnem vzhůru při 4 °C.

4.4. Práce s buněčnými kulturami

4.4.1. Použité pufry

PBS (phosphate buffered saline): 140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,7mM KH₂PO₄; 10mM Na₂HPO₄ × 12 H₂O; pH = 7,4

4.4.2. Buněčné linie

Myší buněčná linie 3T6	linie myších fibroblastů, senzitivní a permissivní pro myší polyomavirus (ATCC; CCL - 96)
Myší buněčná linie NIH 3T3	linie myších embryonálních fibroblastů (ATCC; CRL - 1658)
Myší buněčná linie WOP	buněčná linie myších embryonálních fibroblastů 3T3, která produkuje časné antigeny myšího polyomaviru (Dailey & Basilico, 1985)
3T3 LMNA +/+	buněčná linie myších fibroblastů; kontrolní linie pro buňky 3T3 LMNA -/- (Sullivan et al., 1999). Linie získána od doc. Evy Bártové, PhD; Akademie věd ČR, Brno.
3T3 LMNA -/-	buněčná linie myších fibroblastů s deletovaným genem pro lamin A (Sullivan et al., 1999). Linie získána od doc. Evy Bártové, PhD; Akademie věd ČR, Brno
Lidská b. linie RPTEC/hTERT1	buněčná linie imortalizovaných renálních epiteliálních buněk proximálních tubulů s konstitutivně exprimovanou lidskou telomerázou (Evercyte)
Lidská b. linie HEK 293	buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk imortalizovaných adenovirem

4.4.3. Kultivační média

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich)

DMEM médium s 10% bovinním sérem: DMEM (Sigma-Aldrich); 10% (V/V) fetální bovinní sérum (Thermo Fisher Scientific)

DMEM médium s 10% bovinním sérem a antibiotiky: DMEM (Sigma-Aldrich); 10% (V/V) fetální bovinní sérum (Thermo Fisher Scientific); Antibiotic/antimycotic solution (Sigma-Aldrich)

ProxUp médium: ProxUp Basal medium (Evercyte); ProxUp Supplements (Evercyte) pro RPTEC/hTERT1

RPMI médium: RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)

4.4.4. Viry

Myší polyomavirus BG strain.

4.4.5. Pasážování buněk RPTEC/hTERT1

Z buněčných kultur na Petriho miskách bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem 0,02% EDTA v PBS. Poté byl přidán 0,05% trypsin v 0,2% EDTA v PBS (500 μ l/Petriho miska Ø 60 mm; 1,500 μ l /Petriho miska Ø 100 mm; 3 ml /Petriho miska Ø 150 mm), s nímž byly buňky inkubovány v termostatu při 37 °C dokud nedošlo k uvolnění buněk z povrchu misky (maximálně po dobu 5 min). Následně byl přidán definovaný inhibitor trypsinu (DTI; Thermo Fisher Scientific) ve stejném objemu jako trypsin. Suspenze byla přenesena do plastové zkumavky a centrifugována při laboratorní teplotě a 170 g po dobu 5 min. Pelet byl resuspendován v ProxUp médiu předehřátém na 37 °C a suspenze byla dávkována v poměru 1:2 na nové Petriho misky. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂.

4.4.6. Pasážování buněk 3T6, NIH 3T3, 3T3 LMNA -/-, 3T3 LMNA +/-, HEK 293

Z buněčných kultur narostlých na Petriho miskách bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem 0,02% EDTA v PBS. Poté byl přidán 0,25% trypsin v PBS (300 μ l/Petriho miska Ø 60 mm; 500 μ l /Petriho miska Ø 100 mm; 2 ml /Petriho miska Ø 150 mm), s nímž byly buňky inkubovány v termostatu při 37 °C dokud nedošlo k uvolnění buněk z povrchu misky (maximálně po dobu 5 min). Suspenze buněk byla naředěna v DMEM médiu se sérem. Buňky byly pasážovány v poměru 1:8. Odpovídající množství buněk bylo

přeneseno na nové Petriho misky s DMEM médiem se sérem byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂.

4.4.7. Transfekce buněk RPTEC/hTERT1 nukleofekcí

Nukleofekce byla prováděna pomocí přístroje Amaxa Nucleofector® (Lonza) a komerční soupravy Cell Line Nucleofector™ Kit V (Lonza). Touto metodou byly transfekovány buněčné kultury ve fázi exponenciálního růstu. Z misek bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty roztokem 0,02% EDTA v PBS. Následně bylo přidáno odpovídající množství trypsinu dle velikosti misky (viz 4.4.5.; 4.4.6. Pasážování buněk) a buňky byly inkubovány v termostatu s 5% atmosférou CO₂ při 37 °C maximálně po dobu 5 min. Poté byl trypsin inaktivován stejným množstvím DTI a buňky byly resuspendovány v ProxUp médiu. Za pomoci Bürkerovy komůrky byl určen celkový počet buněk v suspenzi. Požadovaný počet buněk pro jednu transfekci činil 4×10^6 . Alikvot buněčné suspenze s odpovídajícím počtem buněk byl peletován při 170 g po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Po odsátí média byl pelet resuspendován v 100 µl roztoku Amaxa Nucleofector Solution V a bylo přidáno 6 µg plazmidové DNA. Směs byla přenesena do elektroporační kyvety a byla provedena elektroporace (program A-023). Bezprostředně poté bylo přidáno 0,5 ml ProxUp média předeřátého na 37°C. a buňky byly inkubovány 15 min v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂. Následovalo vysetí 1 transfekce na 10 jamek 24 jamkové destičky s předeřátým ProxUp médiem a se sterilizovanými krycími sklíčky na dně jamek. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂.

4.4.8. Transfekce buněk NIH 3T3, WOP, 3T3 LMNA-/- a 3T3 LMNA +/- nukleofekcí

Přístrojové vybavení a komerční souprava používaná pro nukleofekci buněčných kultur ve fázi exponenciálního růstu byly shodné jako v případě buněk RPTEC/hTERT1 (viz 4.4.7. Transfekce buněk RPTEC/hTERT1 nukleofekcí).

Z misek bylo odsáto médium a buňky opláchnuty roztokem 0,02% EDTA v PBS. Následovala inkubace s trypsinem v termostatu při 37 °C maximálně po dobu 5 min. Poté byly buňky resuspendovány v DMEM médiu se sérem a přeneseny do 50 ml zkumavky. Pomocí Bürkerovy komůrky byl určen celkový počet buněk v suspenzi. Alikvot buněčné suspenze s požadovaným počtem buněk pro jednu transfekci (4×10^6) byl peletován při 170 g po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Následně byl pelet resuspendován ve 100 µl roztoku Amaxa Nucleofector Solution V a bylo přidáno 6 µg plazmidové DNA. Směs byla přenesena do elektroporační kyvety a byla provedena elektroporace (program U-030). Bezprostředně poté bylo k buňkám přidáno 0,5 ml RPMI média předeřátého na 37°C. Následovala inkubace

15 min v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂ a vysetí 1 transfekce na 1 Petriho misku Ø 60 mm nebo Ø 100 mm, na 3 jamky 6 jamkové destičky či na 10 jamek 24 jamkové destičky s předeřtým DMEM médiem a sterilizovanými krycími skličky na dně jamek. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂.

4.4.9. Transfekce buněk HEK 293 prostřednictvím kationických polymerů

Transfekce prostřednictvím kationických polymerů byly prováděny pomocí transfekčního roztoku TurboFect (Thermo Fisher Scientific). Buňky byly den před transfekcí vysety do jamek 24 jamkové destičky se sterilními krycími skličky na dně jamek v koncentraci 2×10^5 , aby se v den transfekce nacházely ve fázi exponenciálního růstu. 0,5 µg DNA bylo smícháno se 100 µl DMEM média, směs byla promíchána a následně byly přidány 2 µl TurboFect Transfection Reagent. Směs byla inkubována 15-20 min při laboratorní teplotě. Poté bylo k buňkám přeneseno 100 µl transfekční směsi a transfekční směs byla promíchána s kultivačním médiem. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂.

4.4.10. Infekce buněk za účelem následné biochemické analýzy

Do jamek 6 jamkové destičky byly vysety buňky v koncentraci $1,5-3 \times 10^5$ buněk (dle buněčného typu a rychlosti růstu tak, aby v den infekce dosáhly přibližné konfluence 50 %). Druhý den bylo z jamek skleněnou Pasteurovou pipetou odsáto DMEM médium se sérem a buňky promyty DMEM médiem. Poté bylo do každé jamky přidáno 250 µl virového inokula naředěného v DMEM médiu tak, aby multiplicita infekce dosáhla 10pfu/b. Následně byly buňky inkubovány 1 h v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂. Poté byly do každé jamky přidány 2 ml DMEM média se sérem a antibiotiky a 20 µl antibiotika a buňky byly inkubovány 40 h v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂.

4.4.11. Infekce buněk za účelem následného imunofluorescenčního značení proteinů

Na dna jamek 24 jamkové destičky byla před vysetím buněk umístěna sterilizovaná krycí sklička. Buňky byly vysety tak, aby v den infekce dosáhly 50-70 % konfluence. Po odsátí kultivačního média byly buňky promyty DMEM médiem a k buňkám bylo přidáno 200 µl virové suspenze naředěné v DMEM médiu tak aby byly buňky infikovány s MOI = 0,5 pfu/b. Buňky byly infikovány 1 h v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂. Následně bylo do každé jamky přidáno 800 µl DMEM média se sérem a buňky byly inkubovány 40 h v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂.

4.4.12. Infekce za účelem izolace virového potomstva

Buňky linie 3T6 byly vysety na Petriho misky tak, aby v den infekce dosáhly konfluence 20-25 %. Z misek s narostlými buňkami bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty DMEM médiem. K buňkám byl napipetován 1 ml naředěného virového inokula v DMEM médiu ($MOI=0,05-0,01$ pfu/b), krouživými pohyby byla suspenze rovnoměrně rozprostřena po dně misek a misky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO_2 . Za občasného promísení suspenze byly buňky s virovým inokulem inkubovány 90 min. Po uplynutí doby inkubace bylo přidáno 9 ml DMEM média se sérem a antibiotiky a buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO_2 , dokud se plně nevyvinul cytopatický efekt (7-10 dní).

4.4.13. Izolace viru

Podle Horníkové et al., 2015.

Infikované buněčné kultury v Petriho miskách (celkem 10 misek, Ø 100 mm) byly včetně média třikrát zmrazeny a kompletně rozmrazeny, aby došlo k šetrné lýzy a uvolnění virových částic. Pryžovým škrábátkem byly lyzované buňky uvolněny ze dna misek a suspenze byla peletována centrifugací při 4000 g a 4 °C po dobu 40 min. Supernatant obsahující uvolněné virové částice byl odebrán a skladován ve 4 °C (supernatant 1). Pelet obsahující virové částice navázané nespecificky na buněčnou debris byl resuspendován v 10 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4). Suspenze byla poté přenesena do vychlazeného Potter-Elvehjemova homogenizátoru a homogenizována v 5 cyklech po 10 stlačeních. Mezi jednotlivými cykly byl homogenizátor včetně suspenze chlazen na ledu. Homogenizovaná buněčná suspenze byla poté přenesena do zkumavky, k suspenzi byla přidána neuraminidáza (Sigma-Aldrich) do finální koncentrace 0,01 U/ml a aprotinin (Sigma-Aldrich) do finální koncentrace 2 µg/ml a směs byla za stálého míchání inkubována při pokojové teplotě 16-20 h. V dalším kroku byla suspenze centrifugována při 4000 g a 4 °C po dobu 40 min. Supernatant obsahující virus byl odebrán, spojen s předchozím (supernatantem 1) a uchován při 4 °C. Pelet byl resuspendován v 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 9) a 4 h inkubován za stálého míchání při laboratorní teplotě. Následně byla suspenze centrifugována 40 min při 4000 g a 4 °C, supernatant obsahující virus byl spojen s předchozími a uložen při 4 °C.

Virus obsažený ve spojených supernatantech byl koncentrován diferenciální centrifugací přes sacharózový polštář. Spojené supernatanty obsahující virové částice byly přeneseny do ultracentrifugačních zkumavek určených pro rotor SW28. Pomocí skleněné Pasteurovy pipety byly supernatanty opatrně podvrstveny 5 ml 20% (w/V) sacharózy v pufru B (10 mM Tris-HCl, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 0,01 mM $CaCl_2$). Virus byl peletován při 80 000 g (což u

rotoru Beckman SW28 odpovídá 25 000 rpm) při 4 °C po dobu 3 h. Po ukončení centrifugace byl supernatant odstraněn a pelet virových částic resuspendovány ve 200-600 µl pufru B. Virová suspenze byla alikvotována a uchovávána při -80 °C.

4.4.14. Titrace virového inokula

Do jamek 24 jamkové destičky byla umístěna sterilní krycí sklička a vysety buňky 3T6 tak, aby v den infekce dosáhly konfluence 50-70 %. Virové inokulum bylo naředěno v rozmezí 10^{-2} až 10^{-5} . Z jamek bylo odsáto médium, buňky byly promyty DMEM médiem a bylo přidáno 200 µl virové suspenze v jednotlivých ředěních. Po inkubaci buněk 1 h v termostatu při 37 °C s 5% atmosférou CO₂ bylo k buňkám přidáno 800 µl DMEM média se sérem a antibiotiky a po 24 h byly buňky fixovány a nepřímým imunofluorescenčním značením byl v buňkách detekován LT antigen myšího polyomaviru.

Pro výpočet titru viru bylo vybráno ředění, ve kterém byl počet buněk pozitivních na LT antigen maximálně 40 pozitivních buněk na jedno zorné pole. U vybraného ředění byl spočítán průměrný počet pozitivních buněk na pole a titr viru byl určen dle následujícího vzorce:

$$ffu/ml = n \cdot k \cdot (1/d) \cdot (1/v)$$

ffu.....počet infekčních virových částic

n.....průměrný počet LT pozitivních buněk na pole

k.....faktor zvětšení mikroskopu (určuje se jako plocha jamky 24 jamkové destičky dělená plochou zorného pole

(1/d).....ředění virového inokula

v.....objem ředěné virové suspenze na jamku (ml)

Výsledkem výpočtu je počet infekčních virových částic na 1 ml virového inokula (ffu/ml).

4.5. Práce s proteiny

4.5.1. Protilátky

Protilátky

Primární protilátky

α-MPyV VP1 králičí polyklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MPyV, IF 1:1000 (připravena v naší laboratoři)

α -MPyV VP1	myší polyklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MPyV, IF 1:10 (Morávková, 2001).
α -MPyV VP2/3	myší monoklonální protilátka proti minoritním proteinům VP2/3 MPyV, IF (Forstová et al., 1993)
α -BKV VP1	králíčí polyklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 BKV, IF 1:500 (připravena v naší laboratoři)
α -BKV VP1	myší polyklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 BKV, IF 1:10 (Kozmanová, 2011)
α -SV40 VP2/3	králíčí polyklonální protilátka proti minoritním proteinům VP2/3 viru SV40, rozeznává i minoritní proteiny příbuzného lidského BK viru, IF 1:500 (Abcam)
α -lamin A/C	myší monoklonální protilátka proti laminu A/C, IF 1:100, WB 1:1000 (Cell Signalling Technology)
α -lamin B1	kozí polyklonální protilátka proti laminu B, IF 1:100 (Santa Cruz Biotechnology)
α -lamin B1	králíčí polyklonální protilátka proti laminu B, IF 1:500 (Abcam)
α -LT-antigen	kryší monoklonální protilátka proti LT MPyV, IF 1:50 (Dilworth & Griffin, 1982)
α -MPyV VP1	myší polyklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 myšího polyomaviru, WB 1:100 (Forstová et al., 1993)
α -lamin B1	myší monoklonální protilátka proti laminu B, WB 1:100 (Santa Cruz Biotechnology)
α -GAPDH	králíčí polyklonální protilátka proti GAPDH, WB 1:5000 (Sigma-Aldrich)

Sekundární protilátky

DαRb – AF 546	oslí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor 546, IF 1:1000 (Thermo Fisher Scientific)
GαM – AF 488	kozí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488, IF 1:1000 (Thermo Fisher Scientific)
DαM – AF 488	oslí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488, IF 1:1000 (Thermo Fisher Scientific)
DαG – AF 488	oslí monoklonální protilátka proti kozím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488, IF 1:1000 (Thermo Fisher Scientific)
GαR – AF 488	kozí monoklonální protilátka proti krysím imunoglobulinům IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488, IF 1:1000 (Thermo Fisher Scientific)
GαRb-HRP	kozí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou, WB 1:1000 (Bio-Rad)
GαM-HRP	kozí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou, WB 1:1000 (Bio-Rad)

4.5.2. Lyze buněk pomocí RIPA pufru

Infikované nebo transfekované buňky narostlé v jamkách 6 jamkové destičky byly opláchnuty PBS. Poté byl k buňkám přidán RIPA pufr (50 mM Tris-HCl; pH = 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,05% NP 40 (V/V); 1% deoxycholát sodný (w/V); 1% Triton X-100 (V/V); 1M kyselina amino-kapronová) a buňky byly inkubovány 20 min na ledu. Následně byl supernatant přenesen do mikrozkupek a skladován při -20 °C.

4.5.3. Analýza rozpustnosti laminu A/C v buňkách exprimujících protein VPI

(Kochin et al., 2014)

Z jamek 6 jamkových destiček bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty PBS a rozpustné proteiny byly extrahovány 5 minut ve 100 µl Tritonu X-100 v PBS s inhibitory

proteáz (Complete protease inhibitor cocktail; Roche). Po 5 min inkubace byl supernatant představující rozpustnou frakci přenesen do mikrozkušavek a skladován v -20 °C. Následně bylo přidáno 100 µl ddH₂O a buňky byly ze dna jamek seškrábány pryžovým škrábátkem. Suspenze představující nerozpustnou frakci byla přenesena do mikrozkušavek a skladována při -20 °C. Ekvivalentní množství jednotlivých frakcí bylo separováno SDS proteinovou elektroforézou, separované proteiny byly přeneseny na membránu a proteiny byly označeny specifickými protilátkami. Intenzita jednotlivých pruhů byla určena programem Amersham Imager 600 RGB software a procentuální zastoupení rozpustného laminu A/C bylo určeno dle následujícího vzorce:

$$(S_{\text{lamin A/C}})/(S_{\text{lamin A/C}} + P_{\text{lamin A/C}})$$

Množství rozpustného proteinu VP1 v rozpustné frakci bylo určeno obdobně.

4.5.4. Frakcionace buněk

Pro frakcionaci buněk jsme používali soupravu Nuclear & Cytoplasmic Extraction Kit (G-Biosciences).

Z jamek 6 jamkové destičky bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty roztokem 0,02% EDTA v PBS a k buňkám bylo přidáno 200 µl 0,25% trypsinu v PBS. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37°C dokud nedošlo k jejich uvolnění od podložky (přibližně 5 min). K buněčné suspenzi bylo přidáno 1 ml PBS a buňky byly peletovány 5 min při 500 g a 4°C. K buněčnému peletu bylo přidáno 200 µl vychlazeného SubCell Buffer s koktejlem inhibitorů proteáz (Roche) a pelet byl resuspendován vortexováním 15s. Buněčná směs byla inkubována 10 min na ledu a poté bylo přidáno 10 µl SubCell Lysis Reagent a směs byla vortexována 5 s, inkubována 1 min na ledu a opět vortexována 5 s. Buněčná jádra byla peletována centrifugací 5 min při 20 000 g a 4 °C. Supernatant byl odebrán do vychlazených mikrozkušavek, označen jako cytosolická frakce (c) a skladován při -20°C. Jaderný pelet byl resuspendován ve 40 µl vychlazeného Nuclear Extraction Buffer s koktejlem inhibitorů proteáz (Roche), resuspendován vortexováním 15 s a směs byla inkubována 30 min na ledu s 15 s promícháním vortexováním každých 10 min. Potom byly vzorky centrifugovány 10 min při 20 000 g a 4 °C. Supernatanty byly přeneseny do vychlazených mikrozkušavek a označeny jako jaderná frakce (j). Pelety byly resuspendovány ve 40 µl H₂O a označeny jako nerozpustná frakce (n) frakce byly skladovány při -20 °C.

Ekvivalentní množství jednotlivých frakcí bylo separováno SDS proteinovou elektroforézou, separované proteiny byly přeneseny na membránu a VP1 protein byl označen specifickými protilátkami. Intenzita jednotlivých pruhů byla určena programem Amersham

Imager 600 RGB software a procentuální množství proteinu VP1 (x) v cytoplazmatické frakci bylo určeno dle vzorce:

$$x = (c_{VP1}) / (c_{VP1} + j_{VP1} + n_{VP1})$$

Množství proteinu VP1 v ostatních frakcích bylo určeno obdobně.

4.5.5. Nepřímé imunofluorescenční značení proteinů v buňkách

Z jamek 24 jamkové destičky s buňkami narostlými na krycích sklíčkách bylo odsáto skleněnou Pasteurovou pipetou médium a buňky byly promyty PBS. Poté byly buňky fixovány 0,5 ml 3,7% paraformaldehydu v PBS (PFA) po dobu 15 min při laboratorní teplotě. Po odstranění PFA byly buňky promyty PBS a permeabilizovány 5 min v 0,5 ml Tritonu X-100 v PBS. Poté byly buňky třikrát promyty PBS, načež byly inkubovány 30 min při laboratorní teplotě ve 400 μ l blokačního roztoku (0,25% BSA; 0,25% želatina v PBS).

Buňky byly inkubovány 60-90 min s 250 μ l primární protilátky ředěné v blokačním roztoku, promyty 3 x 10 min v roztoku PBS a inkubovány 30 min s 250 μ l sekundární protilátky ředěné v blokačním roztoku. Od tohoto kroku byly vzorky chráněny před světlem. Poté byla sklíčka opět promyta v PBS 3 x 10 min. V dalším kroku následovalo promytí skel ddH₂O a inkubace 1 min se 150 μ l DAPI v ddH₂O (výsledná koncentrace 1 μ g/ml). Po odsátí DAPI byly buňky promyty ddH₂O, sklíčka byla vyjmuta z jamek a usušena při laboratorní teplotě. Nakonec byla sklíčka stranou s narostlými buňkami montována do kapky 3 μ l Abberior Mount Liquid Antifade (Abberior) na podložní sklo. Buňky s fluorescenčně značenými proteiny byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus IX71) anebo konfokálního mikroskopu (Zeiss LSM880).

4.5.6. Denaturační proteinová elektroforéza SDS-PAGE

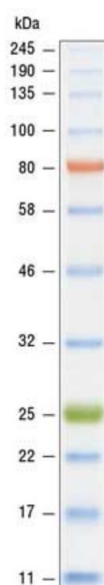
Vzorky byly před nanášením na elektroforézu smíchány s 5 x koncentrovaným Laemmliho pufrém (5% SDS (w/V); 50 mM Tris - HCl pH 6,8; 25 % β -merkaptoetanol (w/V); 50 % glycerol (w/V) a 0,005 % bromfenolová modř (w/V)) v poměru 4:1, a denaturovány 5 min při 100 °C.

Pro separaci proteinů dle jejich molekulové hmotnosti byl používán 5% zaostřovací a 10% separační gel (tab. 2). Pro přípravu polyakrylamidových gelů (PPA) byla sestavena souprava PAGE vertical apparatus Hoefer Mighty Small II (Hoefer). Nejprve bylo napipetováno do aparatury mezi elektroforetická skla malé množství dH₂O pro ověření těsnosti aparatury. Poté byla aparatura vysušena filtračním papírem a přibližně 1 cm pod okraj hřebenu byl napipetován připravený separační gel. Gel byl převrstven izobutanolem syceným vodou pro zamezení přístupu vzduchu, jenž inhibuje polymeraci. Během 30 min, kdy gel

polymeroval, byl připraven gel zaostřovací. Po ztuhnutí gelu a slití a vysušení zbytků izobutanolu filtračním papírem byl napipetován až po horní okraj elektroforetických skel gel zaostřovací. Mezi skla byl poté vložen hřeben a gel byl ponechán polymerovat 20 min. Po opatrném vytažení hřebenu byla skla přenesena do elektroforetické aparatury. Elektroforetickým pufrům (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS (w/V)) byly převrstveny gely v aparatuře a pomocí Hamiltonovy jehly jím byly propláchnuty jamky pro odstranění nezpolymerovaného akrylamidu. Do jedné jamky bylo nanášeno 3 μ l markeru molekulových hmotností Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (New England Biolabs) (obr. 13) a do dalších 5-15 μ l jednotlivých vzorků. Separace proteinů probíhala v elektroforetickém pufru 30 min při napětí 80 V a potom 90-120 min při napětí 140 V.

Složka	10% separační gelu (12 ml)	5% zaostřovací gel (6 ml)
Demineralizovaná voda	3,25 ml	4,22 ml
1 M Tris-HCl pH 8,8 (separační gel)	4,5 ml	-----
1 M Tris-HCl pH 6,8 (zaostřovací gel)	-----	0,75 ml
10% SDS	120 μ l	60 μ l
30 % akrylamid	4 ml	1 ml
10% amonium persulfát	90 μ l	40 μ l
TEMED	8,5 μ l	10 μ l

Tab. 2 Složení elektroforetických gelů.



Obr. 13 Marker molekulových hmotností Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa). (New England Biolabs)

4.5.7. Western blot a imunodetekce proteinů

Po opatrném vyjmutí gelů z elektroforetický skel byla odříznuta zaostřovací část gelu a gel byl vložen do blotovacího pufru (25 mM Tris, 195 mM glycin, 20% metanol (V/V), pH = 8,3) vychlazeného na 4 °C. Pro přenesení proteinů z gelu a jejich imobilizaci na membráně byla používána metoda „wet blot“. V blotovacím pufru byl sestaven blotovací sendvič, který se skládal z plastové mřížky, vrstvy molitanu, 4 filtračních papírů, 1 filtračního papíru Whatman® (Sigma-Aldrich), gelu, nitrocelulózové membrány NC-45 (Serva) a opět 1 filtračního papíru Whatman®, 4 filtračních papírů, vrstvy molitanu a plastové mřížky. Takto sestavený sendvič byl vložen do blotovací aparatury tak, aby byl zcela ponořen do blotovacího pufru. Celá aparatura byla umístěna na led a přenos probíhal při konstantním proudu 250 mA po dobu 1,5 h.

Po skončení přenosu byla nitrocelulózová membrána s proteiny inkubována 30 min v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS a poté s primární protilátkou ředěnou v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS 16-20 h při 4 °C. Následně byla membrána třikrát 10 min promývána v PBS. Poté byla membrána inkubována 30 min při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou a ředěnou v 5% (w/V) odtučněném mléce v PBS. Následovalo finální promývání v PBS třikrát 10 min. Membrána byla vyvolána soupraou Super Signal West Femto Maximum sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) a signál byl detekován přístrojem Amersham™ Imager 600 RGB (GE Healthcare Life Sciences). Intenzita signálu jednotlivých pruhů proteinů byla měřena Amersham™ Imager 600 RGB software (GE Healthcare Life Sciences) a normalizována na hladinu exprese GAPDH (pokud není uvedeno jinak).

5. Výsledky

5.1. Myší polyomavirus

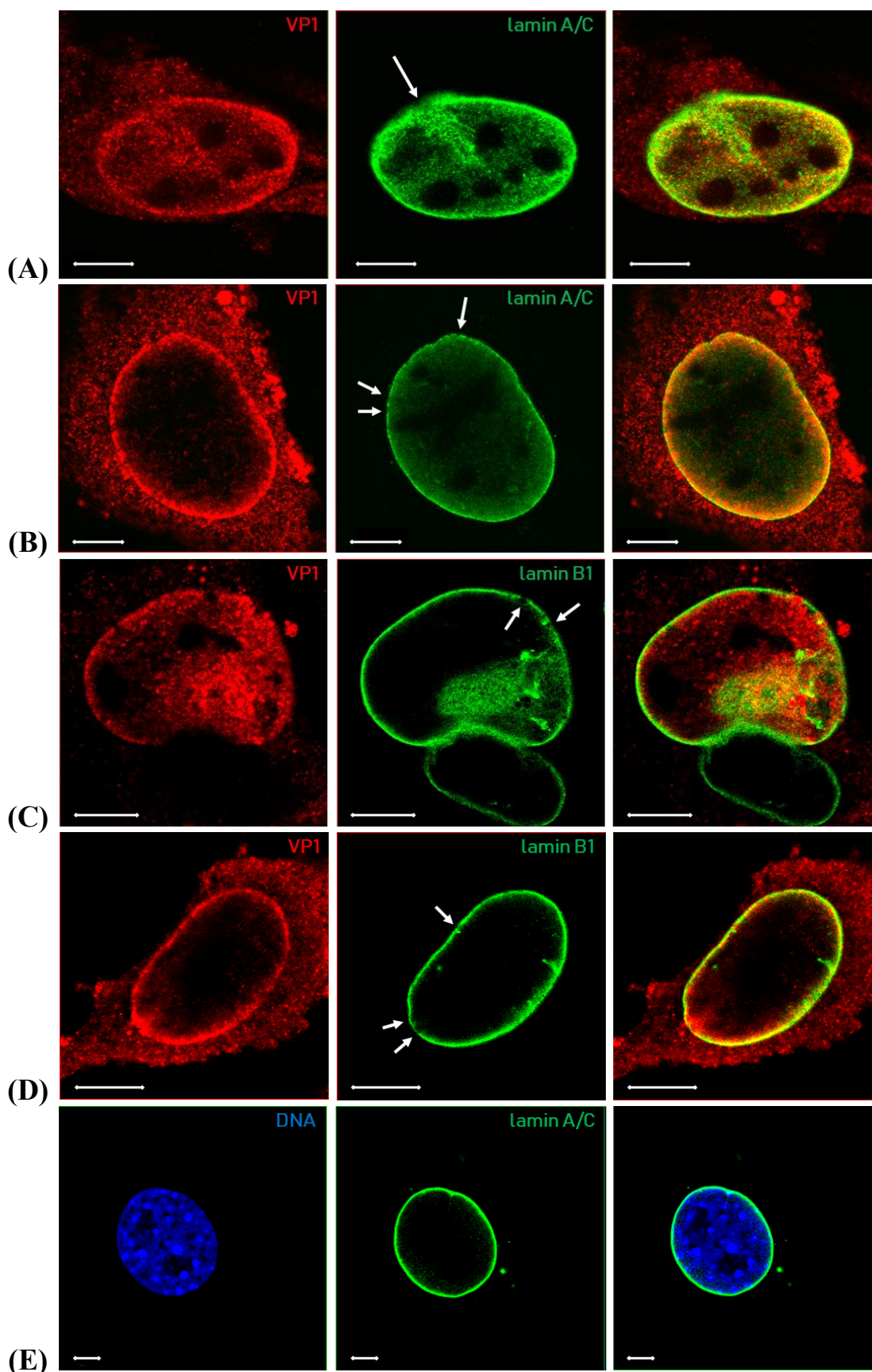
5.1.1. Studium lokalizace proteinu MPyV VP1 v infikovaných a transfekovaných buňkách

Dlouhodobým předmětem našeho studia je charakterizace proteinových interakcí strukturních proteinů a objasnění významu těchto interakcí v kontextu virového replikačního cyklu. V této práci jsme se zaměřili na studium potenciálního vlivu virových strukturních proteinů na vlastnosti jaderného laminu v pozdní fázi infekce.

Jako první jsme izolovali virus, který jsme používali v následujících experimentech. Virus byl izolován podle kapitoly 4.4.13. *Izolace viru* a koncentrován centrifugací přes sacharózový polštář. U izolovaného viru jsme určili infekční titr (kap. 4.4.14. *Titrace virového inokula*) - virový titr $7,3 \cdot 10^7$ ffu/ml.

Nejprve jsme se zaměřili na analýzu lokalizace hlavního strukturního proteinu v infikovaných buňkách v pozdní fázi infekce. Zároveň jsme také chtěli analyzovat stav jaderné laminy v těchto buňkách.

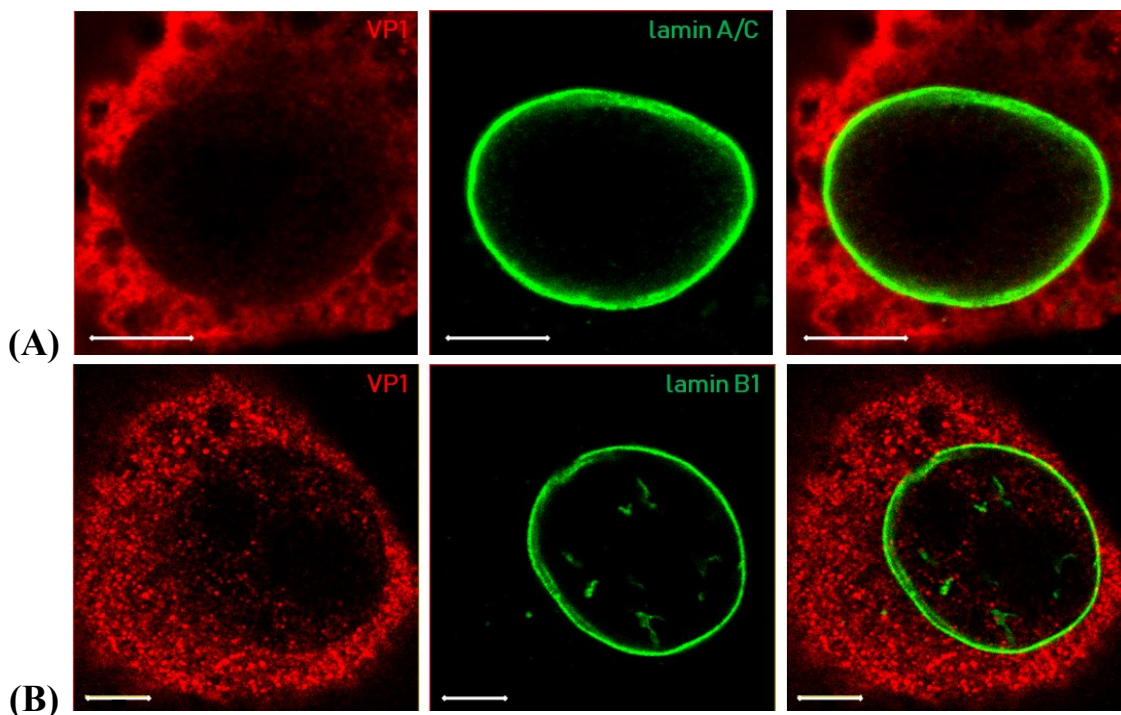
Buňky linie 3T6 jsme infikovali myším polyomavirem (MOI = 1pfu/b), fixovali 40 hpi a specifickými protilátkami jsme detekovali protein VP1 a proteiny jaderné laminy – lamin A/C nebo lamin B1. Protein VP1 byl detekován v jádře i v cytoplazmě (obr. 14 A-D). V jádře se pak protein VP1 vyskytoval téměř výhradně v těsné blízkosti jaderné laminy. Zároveň jsme pozorovali drobné defekty v barvení proteinů jaderné laminy, a to jak u barvení protilátkou proti laminu A/C (obr. 14 A, B), tak i protilátkou specifickou proti laminu B1 (obr. 14 C, D). Tato data naznačují, že infekce buněk vede k akumulaci proteinu VP1 v jádře pod jadernou laminou a k poruchám barvení proteinů jaderné laminy, které v kontrolních buňkách nenacházíme (obr. 14 E).



Obr. 14 Lokalizace hlavního kapsidového proteinu MPyV VP1 a laminů v pozdní fázi infekce. Buňky linie 3T6 byly infikovány MPyV a fixovány 40 hpi. **(A, B)** Protein VP1 (červeně) a lamin A/C (zeleně) byly značeny specifickými protilátkami. **(C, D)** Protein VP1 (červeně) a lamin B1 (zeleně) byly značeny specifickými protilátkami. **Šipky** značí poruchy barvení laminy. **(E)** Neinfikované buňky. Protein lamin A/C (zeleně) byl značen specifickou protilátkou. DNA byla vizualizována DAPI. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 10 μm .

V dalších experimentech jsme testovali, jestli má protein VP1 afinitu k jaderné lamině i v buňkách transientně exprimujících strukturální proteiny. Pro studium těchto procesů jsme nejprve hledali expresní vektor, který po transfekci zajišťuje lokalizaci proteinu VP1 co možná nejpodobnější distribuci VP1 v pozdní fázi infekce.

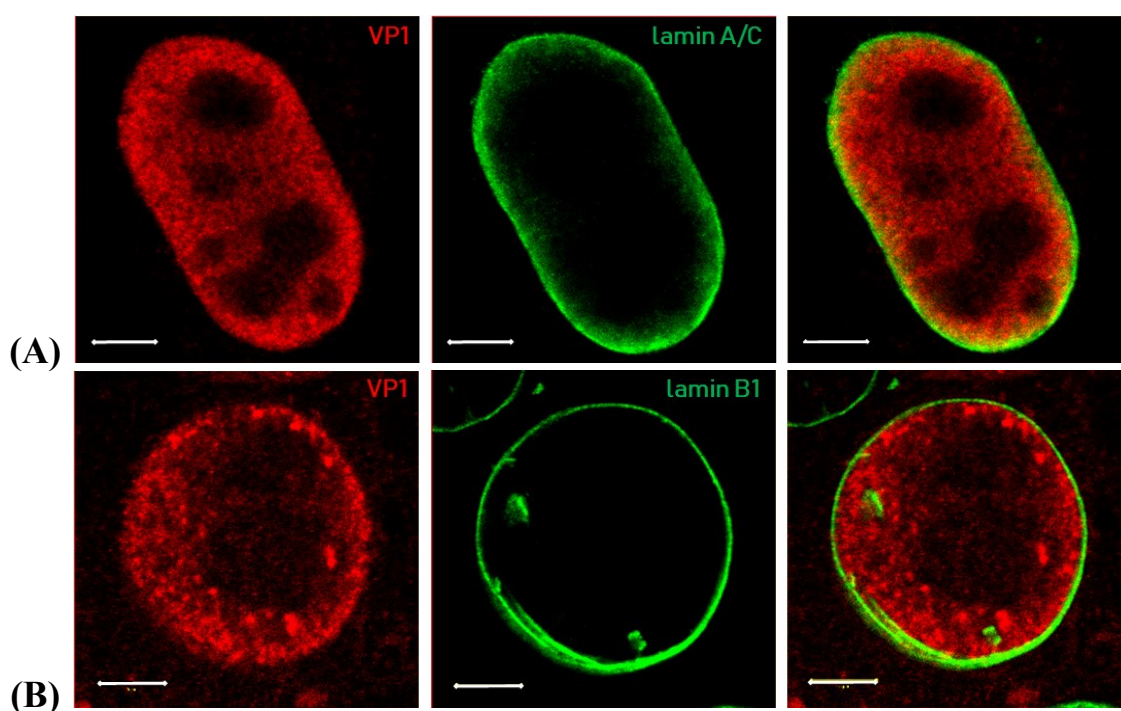
Jak bylo ukázáno dříve (Horníková et al., 2017; Soldatová et al., 2018), pokud je protein VP1 exprimován samostatně, je lokalizován převážně v cytoplazmě. I přes to nás zajímalo, jestli neovlivňuje jadernou laminu. Buňky NIH 3T3 byly transfekovány plazmidem pVP1, 24 h po transfekci (hpt) fixovány a specifickými protilátkami byl detekován protein VP1 a proteiny jaderné laminy – lamin A/C nebo lamin B1. V souladu s předchozími poznatky jsme pozorovali převážně cytoplazmatickou lokalizaci proteinu VP1 a žádnou zjevnou akumulaci proteinu VP1 v jádře či pod jadernou laminou (obr. 15). Stejně tak jsme nepozorovali ani možný vliv exprese proteinu VP1 na jadernou laminu. Na základě těchto pozorování jsme konstrukt pVP1 z dalších experimentů vyloučili.



Obr. 15 Detekce hlavního kapsidového proteinu MPyV VP1 a proteinů laminy v buňkách transfekovaných plazmidem pVP1. Buňky byly transfekovány a fixovány 24 hpt. **(A)** Protein VP1 (červeně) a lamin A/C (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. **(B)** Protein VP1 (červeně) a lamin B1 (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 5 μ m.

Následně jsme buňky NIH 3T3 ko-transfekovali konstrukty pVP1 a pVP2. Předchozí experimenty ukázaly, že ko-exprese proteinu VP1 s minoritním proteinem vede k jaderné lokalizaci proteinu VP1 (Horníková et al., 2017; Soldatova et al., 2018). Protein VP1 v transfekovaných buňkách jsme pozorovali v jádře ve dvou fenotypech: i) difúzním, kdy byl protein detekován rovnoměrně v celé ploše jádra (obr. 16 A) a ii) fenotypu podobném

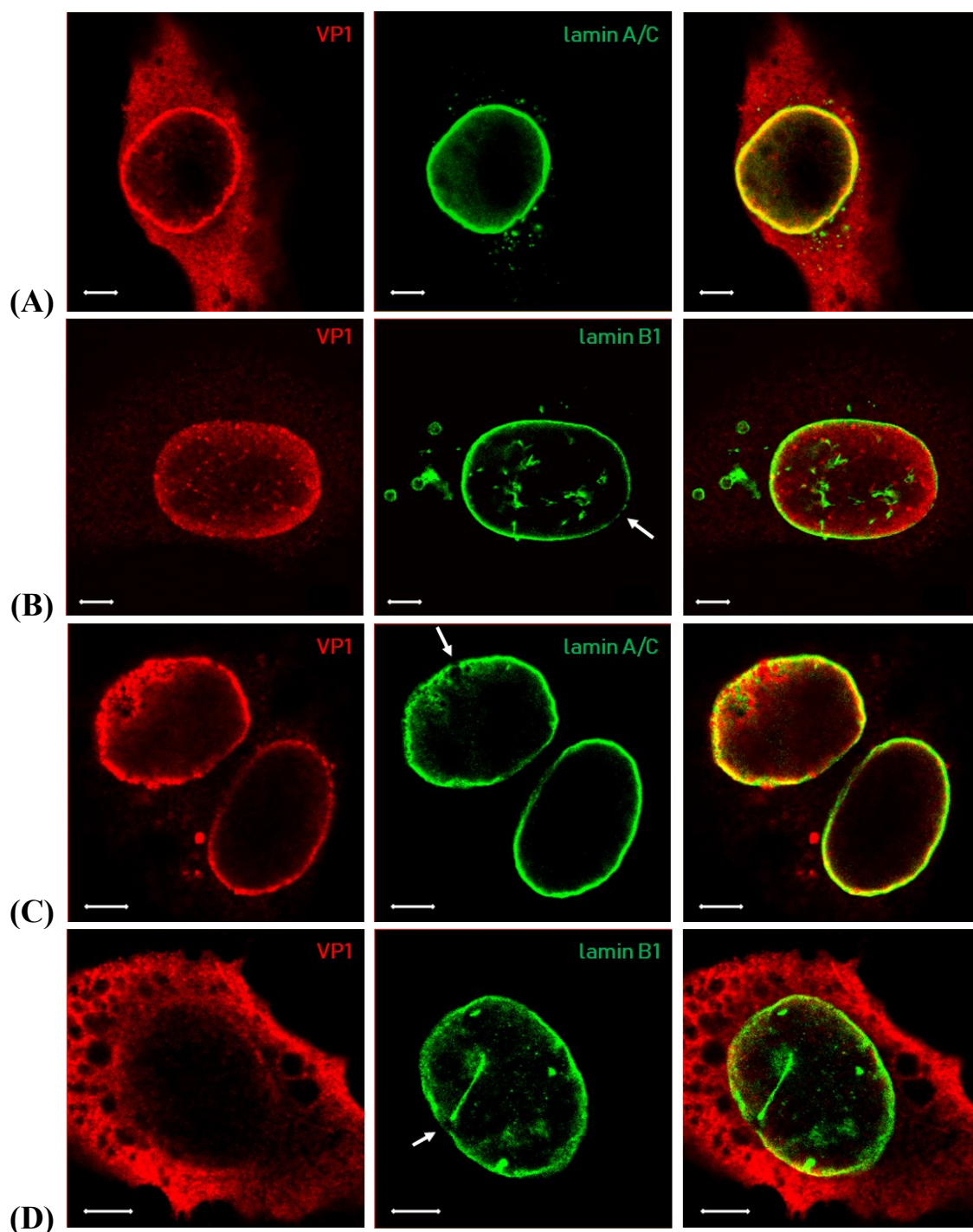
infikovaným buňkám, kdy byl protein VP1 lokalizován pod jadernou laminou (obr. 16 B). Na rozdíl od infikovaných buněk jsme nedetkovali žádné narušení jaderné laminy. Ačkoli jsme protein VP1 detkovali i v blízkosti jaderné laminy, pro další analýzy jsme tento typ transfekce nepoužili. Hlavním důvodem byl problém ko-transfekce dvěma konstrukty. Při ko-transfekci není možné zaručit, že všechny buňky budou transfekovány oběma konstrukty naráz a ve stejném poměru a že bude ve výsledku vznikat v buňce stejné množství proteinu VP1 i VP2. V transfekované populaci se tedy mohou vyskytovat buňky exprimující pouze protein VP2, přičemž individuálně exprimovaný protein VP2 ovlivňuje jadernou laminu (Huerfano et al., 2010). Zároveň výskytem různých buněčných fenotypů v heterogenní populaci by mohlo docházet ke zkreslení výsledků následujících experimentů.



Obr. 16 Detekce hlavního kapsidového proteinu MPyV VP1 a proteinů laminy v buňkách ko-transfekovaných plazmidy pVP1 a pVP2. Buňky byly ko-transfekovány a fixovány 24 hpt. **(A)** Proteiny VP1 (červeně) a lamin A/C (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. **(B)** Proteiny VP1 (červeně) a lamin B1 (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 5 μ m.

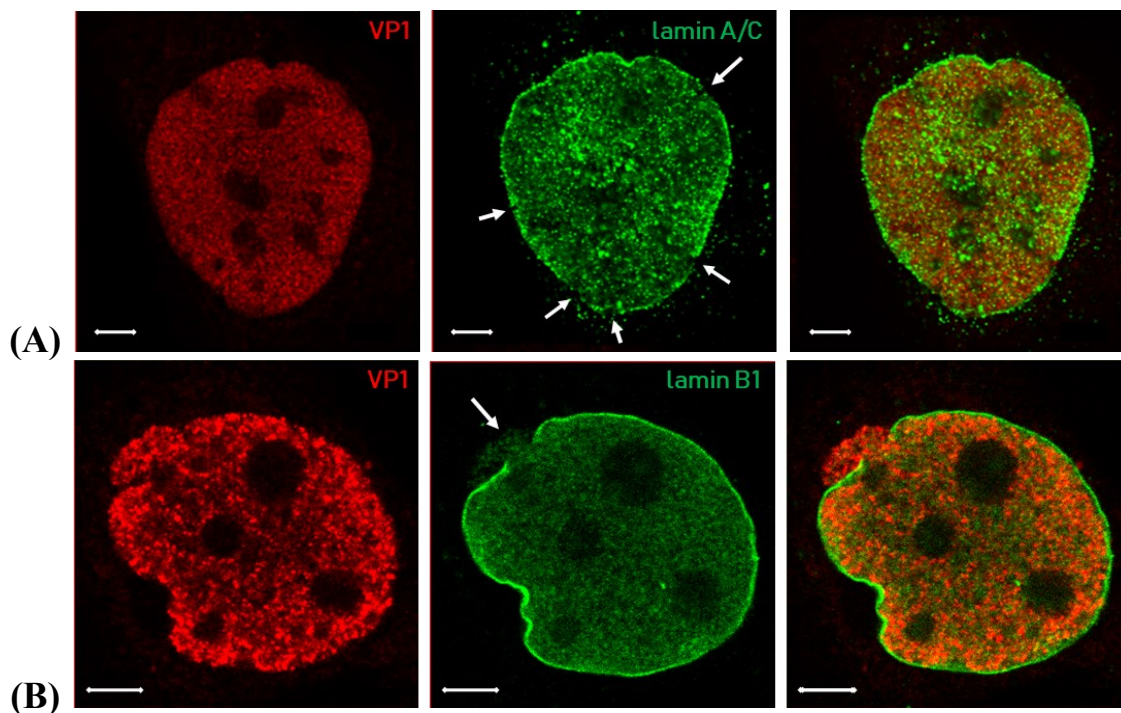
Dalším konstruktem, který jsme testovali, byl pMPyV LATE. Předpokládali jsme, že tento plazmid bude mimikovat nej přesněji situaci v infikovaných buňkách. Byl totiž navržen tak, aby umožňoval nejenom expresi všech strukturních proteinů, ale také aby byly proteiny exprimovány v poměrech co nejvíce napodobujících poměry strukturních proteinů v infikovaných buňkách. Dle našich předpokladů byly majoritním fenotypem buňky s proteinem VP1 jak v cytoplazmě, tak i v jádře nahromaděným pod jadernou laminou (obr. 17 A). Minoritním fenotypem pak byly buňky s buď převážně jadernou (obr. 17 B, C) nebo převážně cytoplazmatickou lokalizací proteinu VP1 (obr. 17 D). Podobně jako v infikovaných

buňkách jsme pozorovali defekty v barvení jaderné laminy, proto jsme se rozhodli používat tento konstrukt v následujících experimentech.



Obr. 17 Detekce hlavního kapsidového proteinu MPyV VP1 a proteinů laminy v buňkách transfekovaných konstruktem pMPyV LATE. Buňky byly transfekovány a fixovány 24 hpt. **(A)** Majoritní fenotyp lokalizace proteinu VP1. **(B, C)** Minoritní fenotyp s převážně jadernou lokalizací proteinu VP1. **(D)** Minoritní fenotyp s převážně cytoplazmatickou lokalizací proteinu VP1. Protein VP1 (červeně), lamin A/C (zeleně) a lamin B1 (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. Šipky značí poruchy barvení laminy. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 5 μm .

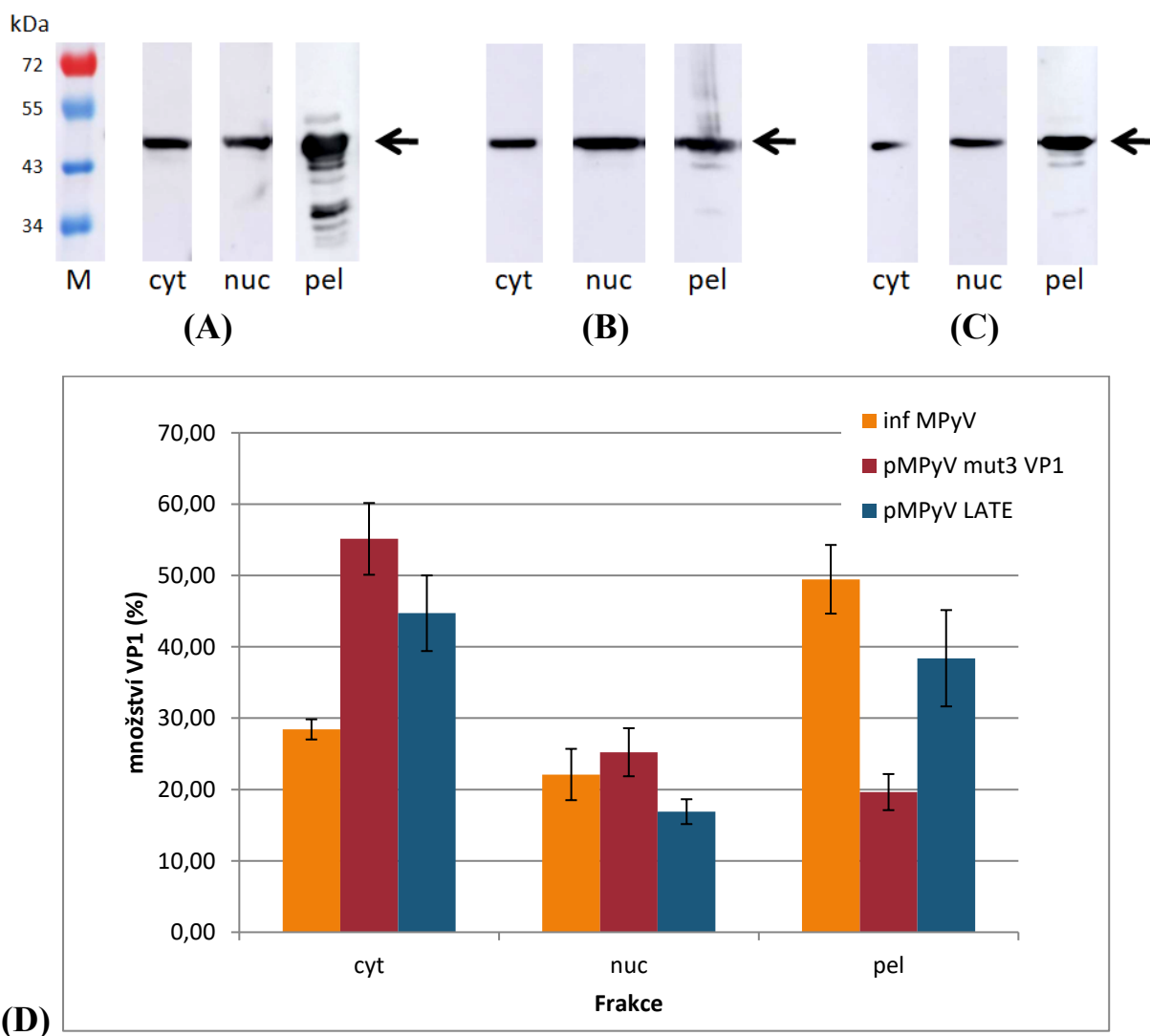
Posledním konstruktem, který jsme ověřovali, byl plazmid pMPyV mut3 VP1. Tento expresní vektor kóduje protein VP1 mutovaný v NLS (K6Q-S7R-G8R), který do jádra vstupuje nezávisle na přítomnosti minoritních proteinů (Soldatova et al., 2018). Protein VP1 jsme v transfekovaných buňkách pozorovali hlavně v jádře, kde byl lokalizován převážně difúzně. Přestože protein VP1 nevykazoval žádnou výraznou asociaci s jadernou laminou, pozorovali jsme defekty barvení jaderné laminy. Zároveň jaderná lamina v buňkách exprimujících protein VP1 byla často „pokroucená“ a obsahovala množství záhybů (obr. 18). Tento konstrukt jsme se tedy rozhodli použít pro následující experimenty.



Obr. 18 Detekce proteinu MPyV VP1 a proteinů laminy v buňkách transfekovaných konstruktem pMPyV mut3 VP1. Buňky byly transfekovány a fixovány 24 hpt. **(A)** Proteiny VP1 (červeně) a lamin A/C (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. **(B)** Proteiny VP1 (červeně) a lamin B1 (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. **Šipky** značí poruchy barvení laminy. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 5 μ m.

Pro potvrzení našich pozorování týkajících se lokalizace proteinu VP1 v buňkách jsme stanovili množství proteinu VP1 v jádře a cytoplazmě v infikovaných buňkách a v buňkách exprimujících strukturní proteiny. Frakcionovali jsme infikované buňky (40 hpi) a buňky NIH 3T3 transfekované plazmidem pMPyV mut3 VP1 a buňky NIH 3T3 transfekované plazmidem pMPyV LATE (24 hpt). Frakcionací buněk jsme získali i) cytoplazmatickou frakci (*cyt*) obsahující rozpustné cytoplazmatické proteiny, ii) jadernou frakci (*nuc*) obsahující rozpustné jaderné proteiny a iii) pelet (*pel*) nerozpustných jaderných a cytoplazmatických proteinů. Proteiny v jednotlivých frakcích byly separovány SDS-PAGE, přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou. Množství proteinu VP1 ve frakcích bylo určeno analýzou western blotů (obr. 19 A-C).

V jaderné frakci (nuc) jsme detekovali přibližně stejné množství proteinu VP1 jak v infikovaných, tak i v transfekovaných buňkách. Rozdíl byl v množství proteinu VP1 v cytoplazmatické a nerozpustné frakci. V infikovaných buňkách se největší množství proteinu VP1 nacházelo v nerozpustné frakci. Velmi podobná distribuce proteinu VP1 byla pozorována u buněk transfekovaných plazmidem pMPyV LATE. V buňkách transfekovaných plazmidem pMPyV mut3 VP1 se nejvíce proteinu VP1 vyskytovalo v cytoplazmatické frakci. Tato data potvrzují naše výsledky imunofluorescenční studie lokalizace proteinu VP1, tedy že v buňkách transfekovaných konstruktem pMPyV LATE vykazuje protein VP1 obdobnou lokalizaci jako v infikovaných buňkách.



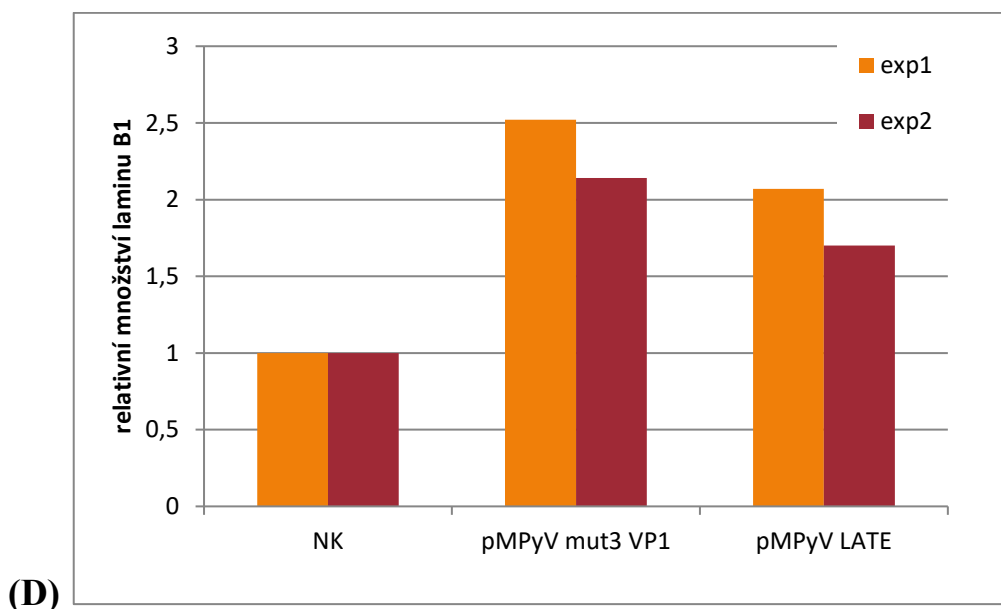
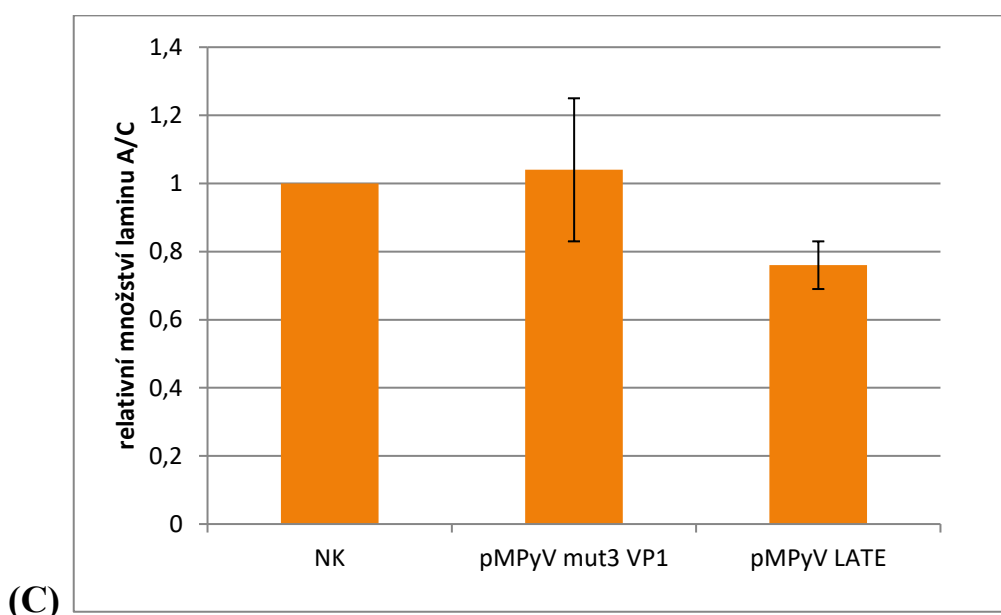
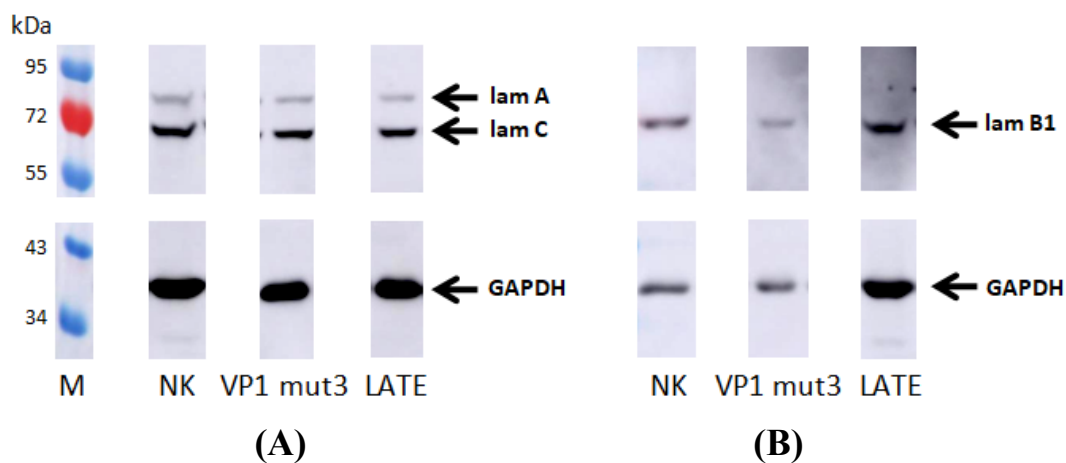
Obr. 19 Množství proteinu VP1 v jednotlivých frakcích. (A) Buňky linie 3T6 byly infikovány a 40 hpi frakcionovány. (B) Buňky NIH 3T3 byly transfekovány plazmidem pMPyV mut3 VP1 nebo (C) plazmidem pMPyV LATE a 24 hpt frakcionovány do frakcí obsahující rozpustné cytoplazmatické proteiny (cyt), rozpustné jaderné proteiny (nuc) a nerozpustné jaderné a cytoplazmatické proteiny (pel). Proteiny obsažené v jednotlivých frakcích byly separovány SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a protein VP1 (45 kDa, označen šipkou) byl detekován specifickou protilátkou. Na elektroforézu bylo aplikováno 1/16,6 objemu cytoplazmatické frakce a 1/10 objemu jaderné frakce a frakce obsahující nerozpustné proteiny. M – marker molekulových vah. (D) Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze tří nezávislých experimentů. Ukázáno je procentuální zastoupení množství proteinu VP1 v jednotlivých frakcích.

5.1.2. Vliv exprese strukturních proteinů na množství laminu A/C a laminu B1 v buňce

Při imunofluorescenčních experimentech jsme pozorovali kolokalizaci proteinu VP1 s laminou a některá pozorování také ukazovala narušení barvení proteinů jaderné laminy. Tato pozorování naznačují možné narušení integrity laminy proteinem VP1. Proto nás zajímalo, zda dochází ke změnám množství hladiny laminů v souvislosti s expresí strukturních proteinů v buňkách. V dalších experimentech jsme se zaměřili na analýzu buněk transientně exprimujících strukturní proteiny. Pro následné biochemické studie jsme použili buňky WOP (3T3 fibroblasty konstitutivně produkující LTA_g MPyV), které se dají transfekovat s vysokou účinností (85-90 % versus 30-40 % u linie NIH 3T3).

WOP buňky byly transfekovány konstruktem pMPyV mut3 VP1 nebo konstruktem pMPyV LATE a lyzovány RIPA pufrem po 24 h. Množství laminu A/C, laminu B1 a GAPDH bylo analyzováno pomocí western blotu (obr. 20 A, B). Množství laminu A/C a laminu B1 v transfekovaných buňkách bylo porovnáváno s množstvím laminárních proteinů v kontrolních (mock transfekovaných) buňkách (obr. 20 C, D).

Zjistili jsme, že relativní množství laminu A/C v buňkách transfekovaných konstruktem pMPyV LATE vůči kontrole klesalo, zatímco u buněk transfekovaných konstruktem pMPyV mut3 VP1 k podobné změně nedocházelo (obr. 20 C). Oproti tomu relativní množství laminu B1 vůči kontrole u obou konstruktů pMPyV mut3 VP1 i pMPyV LATE výrazně vzrostlo (obr. 20 D).

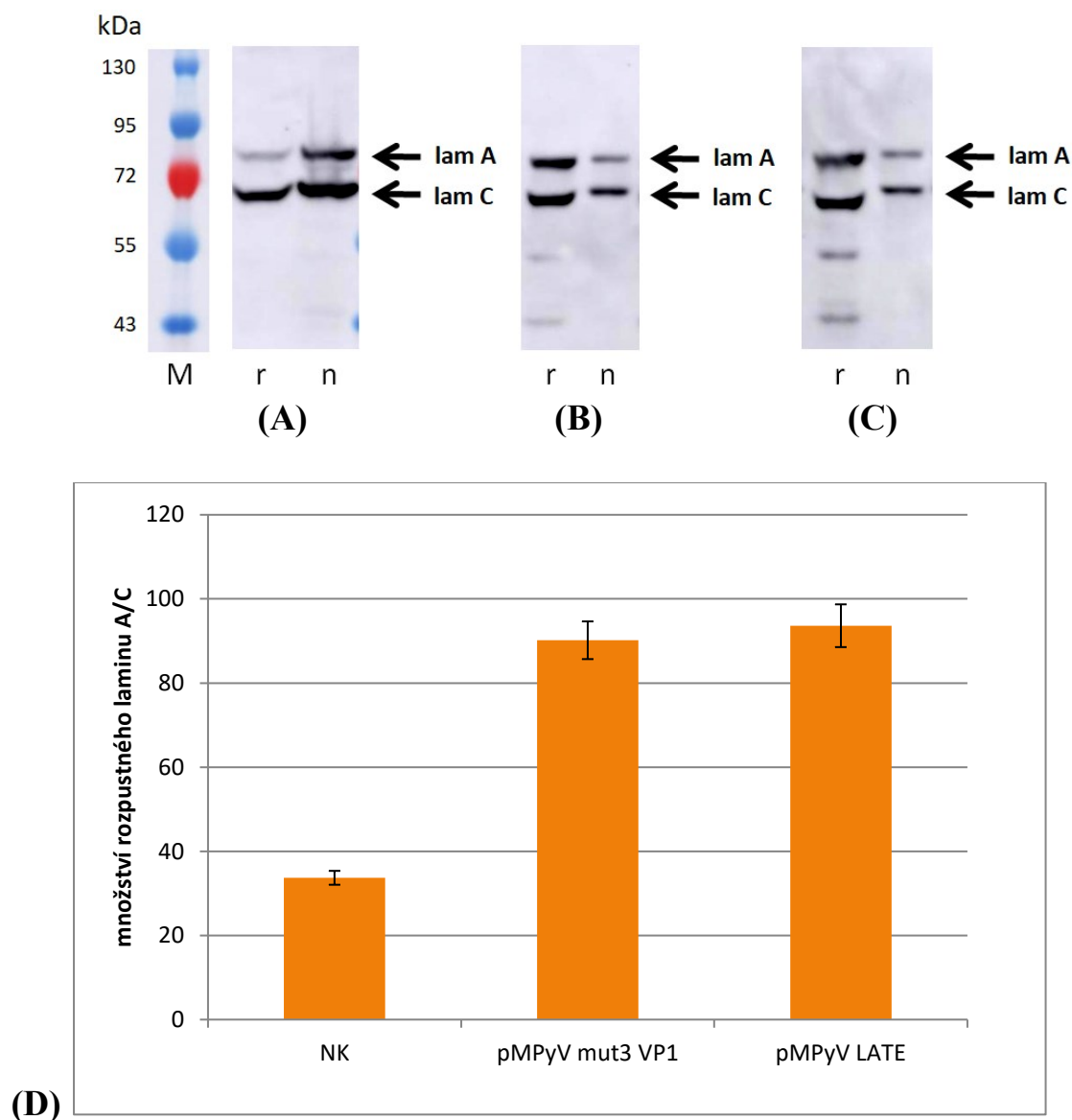


Obr. 20 Množství laminu A/C a laminu B1 v buňkách transientně exprimující strukturní proteiny. WOP buňky byly transfekovány plazmidem pMPyV mut3 VP1 (**mut3 VP1**) nebo plazmidem pMPyV LATE (**LATE**) a 24 hpt lyzovány. Lyzáty byly separovány SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a proteiny byly detekovány specifickými protilátkami. **(A)** Lamin A 74 kDa; lamin C 65 kD, GAPDH 35 kDa. **(B)** Lamin B1 72 kDa; GAPDH 35 kDa. **(C, D)** Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze **(C)** tří nebo **(D)** dvou nezávislých experimentů. Ukázána je relativní změna vztažená k množství proteinu v kontrolních buňkách (**NK**).

5.1.3. Vliv exprese strukturních proteinů na rozpustnost laminu A/C v buňce

Na základě výsledku předchozího experimentu, kde jsme pozorovali snížení hladiny laminu A/C v buňkách transfekovaných konstruktem pMPyV LATE, jsme se dále zaměřili na bližší charakterizaci laminu A/C v transfekovaných buňkách. U laminu A/C bylo popsáno množství posttranslačních modifikací, z nichž některé, jako například fosforylace, mohou ovlivňovat rozpustnost proteinu (Kochin et al., 2014). Námi pozorované defekty barvení by kromě degradace proteinu mohli být vysvětleny také změnou jeho rozpustnosti a přesunem z laminu do nukleoplazmy jádra. Proto nás zajímalo, jestli v buňkách exprimujících strukturní proteiny dochází ke změně rozpustnosti laminu A/C. WOP buňky byly transfekovány plazmidy pMPyV mut3 VP1 nebo pMPyV LATE a 24 hpt byly rozpustné proteiny z buněk extrahovány roztokem 0,5% Tritonu X-100 v PBS. Po extrakci jsme získali supernatant (rozpuštěná frakce – r) a pelet (nerozpuštěná frakce – n). Množství laminu A/C v jednotlivých frakcích v transfekovaných a kontrolních (mock transfekovaných) buňkách bylo analyzováno pomocí western blotu (obr. 21 A-C).

Zjistili jsme, že rozpustnost laminu A/C u buněk exprimujících protein VP1 dramaticky roste. Zatímco u kontrolních buněk se nachází v rozpustném stavu 33,7 % (sd. 1,65 %) laminu A/C, u buněk transfekovaných pMPyV mut3 VP1 toto množství činí 90,17 % (sd. 4,48 %) a u buněk transfekovaných pMPyV LATE 93,62 % (sd. 5,08 %) (obr. 21 D). Tato data naznačují, že přítomnost strukturních proteinů v buňce ovlivňuje posttranslační modifikace laminu A/C.



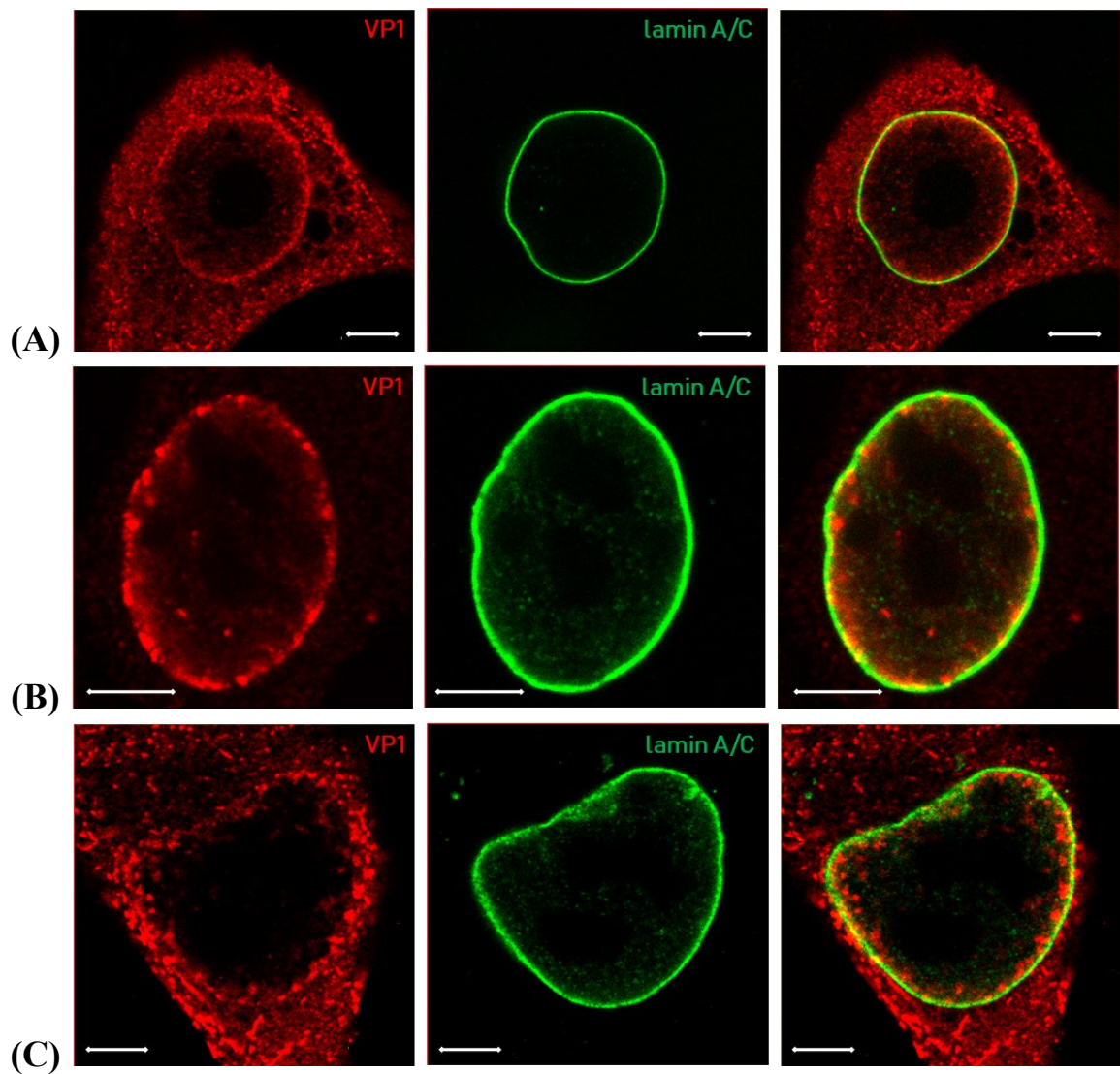
Obr. 21 Vliv exprese strukturních proteinů na rozpustnost laminu A/C. WOP buňky byly transfekovány (A) mock, (B) plazmidem pMPyV mut3 VP1 a (C) plazmidem pMPyV LATE a 24 hpt frakcionovány roztokem 0,5% Tritonu X-100 v PBS do frakcí obsahujících rozpustné proteiny (r) a nerozpustné proteiny (n). Proteiny obsažené v jednotlivých frakcích byly separovány SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a lamin A/C byl detekován specifickou protilátkou. Na elektroforézu bylo aplikováno ekvivalentní množství z obou frakcí. Lamin A 74 kDa; lamin C 65 kDa. **M** – marker molekulových vah. (D) Grafické znázornění denzitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze tří nezávislých experimentů. Ukázáno je procentuální zastoupení množství laminu A/C v jednotlivých frakcích. **NK** – kontrolní (mock transfekované) buňky.

5.1.4. Studium lokalizace proteinu VP1 v buňkách s deletovaným genem pro lamin A

Některé virové čeledě ovlivňují fosforylaci laminu A/C a zvyšují tak jeho rozpustnost, což má za následek fyzické narušení laminy. Tímto způsobem si viry usnadňují uvolnění virových partikul z jádra v pozdní fázi infekce. Naše data naznačují, že strukturní proteiny MPyV ovlivňují rozpustnost laminu A/C, a proto by i ony mohly usnadňovat uvolnění virionů z jádra v pozdních fázích infekce.

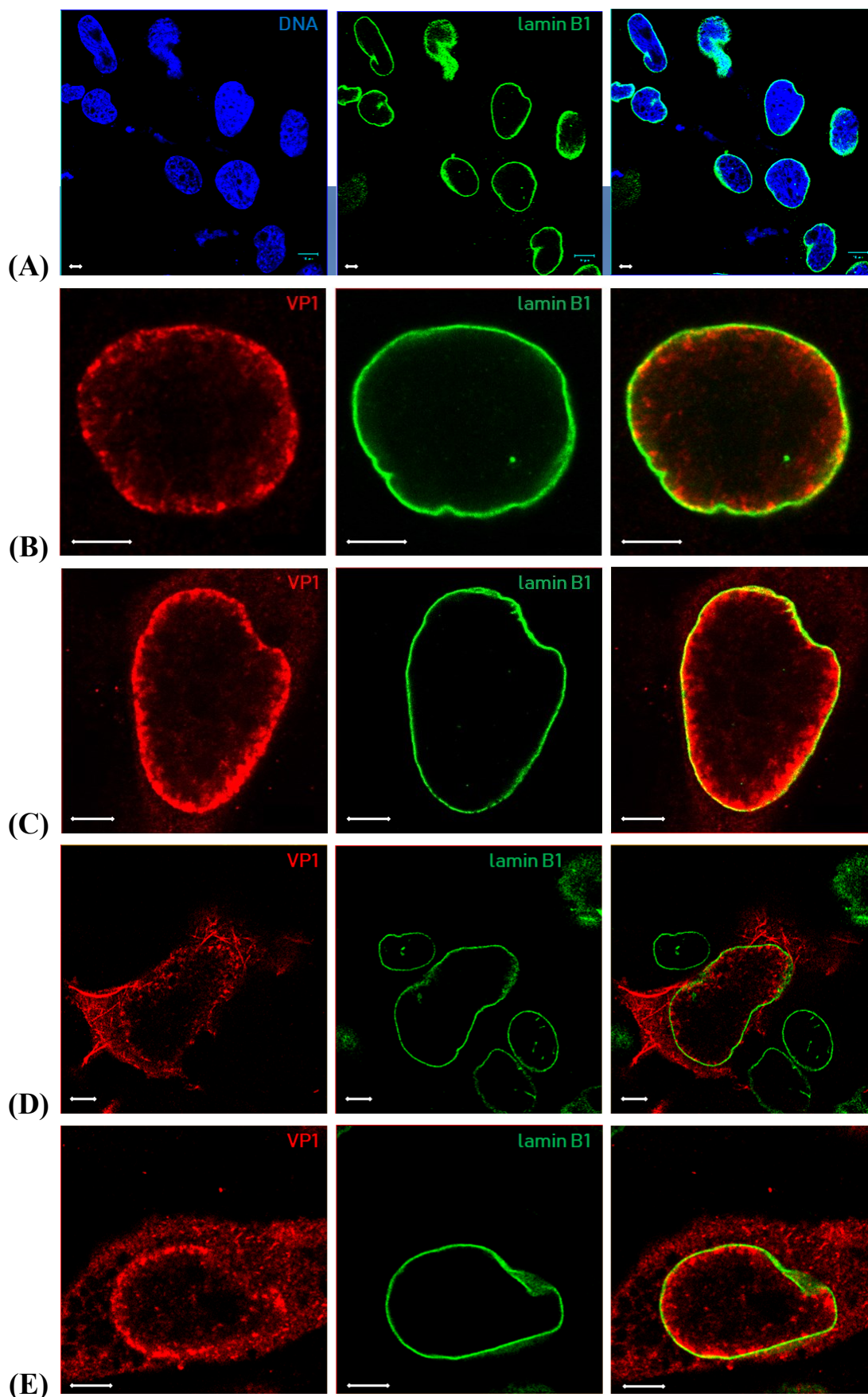
Předpokládali jsme, že nepřítomnost laminu A/C v buňkách bude mít za následek změnu lokalizace proteinu VP1 v buňce, a to vyšší míru výskytu proteinu VP1 v cytoplazmě a nebo zvýšené množství proteinu VP1 v nukleoplazmě. Proto jsme analyzovali lokalizaci proteinu VP1 v buňkách 3T3 LMNA $-/-$ neexprimujících lamin A/C (LMNA $-/-$).

Nejprve jsme overili, zda se lokalizace proteinu VP1 v buňkách wt 3T3 LMNA $+/+$ (LMNA $+/+$) transfekovaných pMPyV LATE shoduje s lokalizací, kterou jsme pozorovali v předchozích experimentech. Buňky LMNA $+/+$ jsme transfekovali plazmidem pMPyV LATE a 24 hpt byl protein VP1 značen specifickou protilátkou. Pro jasné určení hranice jádra a lokalizace proteinu v jádře jsme jadernou laminu označili specifickou protilátkou proti laminu A/C (obr. 22). Dle našich předpokladů se výskyt majoritních i minoritních fenotypů vzhledem k lokalizaci proteinu VP1 shodoval s předchozími pozorováními u buněk linie NIH 3T3. Převážně jsme protein VP1 pozorovali jak v cytoplazmě, tak i v jádře nahromaděný pod jadernou laminou (obr 22 A), minoritním fenotypem pak byly buňky s převážně jadernou (obr. 22 B) a převážně cytoplazmatickou (obr. 22 C) lokalizací.



Obr. 22 Detekce hlavního kapsidového proteinu MPyV VP1 a laminu A/C v LMNA +/+ buňkách transfekovaných konstruktem pMPyV LATE. Buňky byly transfekovány a fixovány 24 hpt. **(A)** Majoritní fenotyp lokalizace proteinu VP1. **(B)** Minoritní fenotyp s převážně jadernou lokalizací proteinu VP1. **(C)** Minoritní fenotyp s převážně cytoplazmatickou lokalizací proteinu VP1. Protein VP1 (červeně) a lamin A/C (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 5 μm .

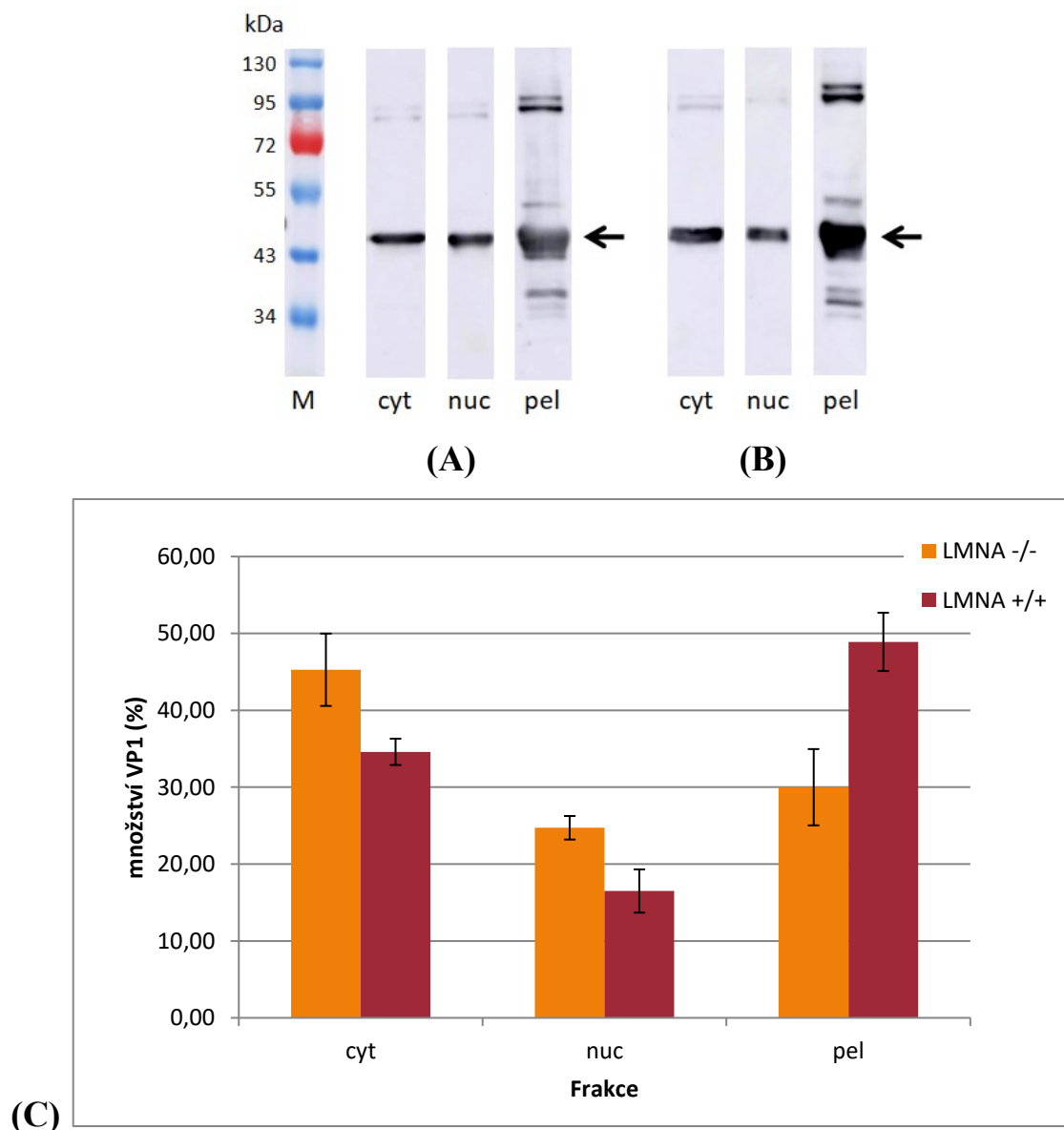
Poté jsme porovnávali lokalizaci proteinu VP1 v LMNA $-/-$ buňkách. Jádra netransfekovaných LMNA $-/-$ buněk měla nepravidelný tvar naznačující nedostatek mechanické opory (obr. 23 A). Majoritní lokalizace proteinu VP1 v buňkách LMNA $-/-$ byla nukleoplazmatická s drobnými shluky proteinu VP1, s výraznou lokalizací proteinu VP1 pod laminou (obr. 23 B) a jaderná perinukleární s částečně cytoplazmatickou lokalizací (obr. 23 C). Minoritním fenotypem pak byla výhradně cytoplazmatická lokalizace proteinu VP1 (obr. 23 D). Kolokalizace proteinu VP1 s laminou v obou typech buněk (LMNA $+/+$ i LMNA $-/-$) naznačuje, že pro interakci proteinu VP1 s jadernou laminou je pravděpodobně nezbytná přítomnost laminu B. Lamin A/C může v průběhu infekce představovat fyzickou bariéru pro únik nově vzniklých virionů z jádra nebo může sloužit jako „lešení“ pro důležité virové procesy. Data získaná z imunofluorescenční analýzy naznačují, že v průběhu infekce MPyV může lamin A/C zastávat obě tyto funkce.



Obr. 23 Detekce hlavního kapsidového proteinu MPyV VP1 a laminu B1 v mock a pMPyV LATE transfekovaných LMNA ^{-/-} a LMNA ^{+/+} buňkách. Buňky LMNA ^{-/-} byly (A) mock transfekovány a (B, C, D) transfekovány konstruktem pMPyV LATE a fixovány 24 hpt. Buňky (E) LMNA ^{+/+} byly transfekovány konstruktem pMPyV LATE a fixovány 24hpt. Proteiny VP1 (červeně) a lamin B1 (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. DNA byla vizualizována DAPI. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 5 μm.

Pro ověření našich pozorování týkajících se role laminu A/C v životním cyklu viru jsme porovnali množství proteinu VP1 v jádře a cytoplazmě buněk LMNA $-/-$ a LMNA $+/+$. Pro toto srovnání jsme použili infikované buňky, protože jsme předpokládali, že při infekci budou případné rozdíly v lokalizaci proteinu VP1 nejmarkantnější. Infikované buňky LMNA $-/-$ a LMNA $+/+$ jsme frakcionovali 40 hpi. Frakcionací buněk jsme získali i) cytoplazmatickou frakci (cyt) obsahující rozpustné cytoplazmatické proteiny, ii) jadernou frakci (nuc) obsahující rozpustné jaderné proteiny a iii) pelet (pel) nerozpustných jaderných a cytoplazmatických proteinů. Proteiny v jednotlivých frakcích byly separovány SDS-PAGE, přeneseny na membránu a protein VP1 byl detekován specifickou protilátkou. Množství proteinu VP1 ve frakcích bylo určeno analýzou western blotů (obr. 24 A, B).

V jaderné frakci (nuc) LMNA $-/-$ buněk bylo detekováno více proteinu VP1 než u LMNA $+/+$ buněk, což odpovídá našim pozorováním při imunofluorescenční analýze. Navíc se největší množství proteinu VP1 u LMNA $-/-$ buněk nacházelo v cytoplazmatické frakci (cyt). Oproti tomu v LMNA $+/+$ buňkách se nejvíce proteinu VP1 vyskytovalo v nerozpustné frakci (pel) (obr. 24 C). Tato pozorování naznačují, že lamin A/C může představovat fyzickou bariérou v úniku virionů z jádra (vyšší množství proteinu VP1 v cytoplazmatické frakci u LMNA $-/-$ buněk) a zároveň je pravděpodobně i „lešením“ pro tvorbu virových komplexů, což je indikováno zvýšeným množstvím rozpustného VP1 v LMNA $-/-$ buňkách).



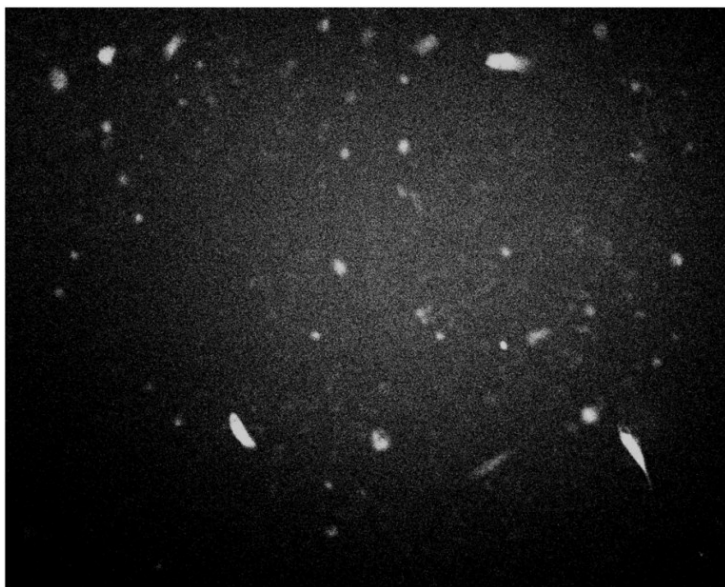
Obr. 24 Množství proteinu VP1 v jednotlivých frakcích. Buňky linie (A) 3T3 LMNA $-/-$ a (B) 3T3 LMNA $+/+$ byly infikovány a 40 hpi frakcionovány do frakcí obsahující rozpustné cytoplazmatické proteiny (**cyt**), rozpustné jaderné proteiny (**nuc**) a nerozpustné jaderné a cytoplazmatické proteiny (**pel**). Proteiny obsažené v jednotlivých frakcích byly separovány SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu a protein VP1 (45 kDa, označen **šipkou**) byl detekován specifickou protilátkou. Na elektroforézu bylo aplikováno 1/16,6 objemu cytoplazmatické frakce a 1/10 objemu jaderné frakce a frakce obsahující nerozpustné proteiny. **M** – marker molekulových vah. (C) Grafické znázornění densitometrické analýzy digitálních snímků western blotů ze dvou nezávislých experimentů. Ukázáno je procentuální zastoupení množství proteinu VP1 v jednotlivých frakcích.

5.2. BK virus

Pro studium interakcí strukturních proteinů BK viru s proteiny jaderné laminy bylo nutné nejprve optimalizovat metodu transfekce buněk RPTEC/hTERT1 a připravit vektor umožňující expresi pozdních proteinů BKV.

5.2.1. Optimalizace transfekce savčích buněk RPTEC/hTERT1 nukleofekcí

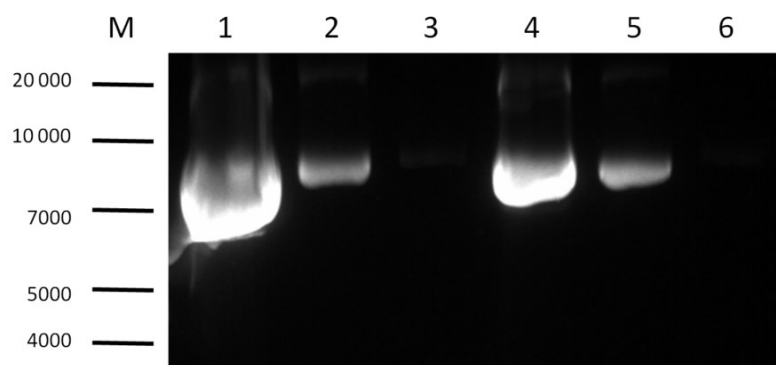
Pro transfekci buněk RPTEC/hTERT1 jsme zvolili metodu nukleofekce pomocí přístroje Amaxa Nucleofector® (Lonza) a transfekční soupravy Cell Line Nucleofector™ Kit V (Lonza). Buňky jsme transfekovali plazmidem kódujícím GFP, který je součástí soupravy a dá se použít pro určení efektivity transfekce buněk. Konkrétně jsme použili 4×10^6 buněk, které jsme transfekovali 3 μg nebo 6 μg plazmidové DNA za použití programu A-023 a Q-001. Celkem tedy 4 varianty. Po 24h inkubaci byly transfekované buňky exprimující GFP protein vizualizovány fluorescenčním mikroskopem a byla určena efektivita transfekce. Jako nejvhodnější z hlediska efektivity transfekce a přežívání buněk se ukázalo ředění 6 μg DNA na 4×10^6 buněk a použití programu A-023 (obr. 25). Při použití programu Q-001 jsme pozorovali vysokou míru cytotoxicity a efektivita transfekce byla vyšší při použití 6 μg DNA pro transfekci programem A-023. Signál GFP byl detekován pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu.



Obr. 25 Detekce proteinu GFP v buňkách RPTEC/hTERT1. Buňky byly transfekovány plazmidem kódujícím GFP a pozorovány 24 hpt.

5.2.2. Lokalizace proteinu VP1 v transfekovaných buňkách

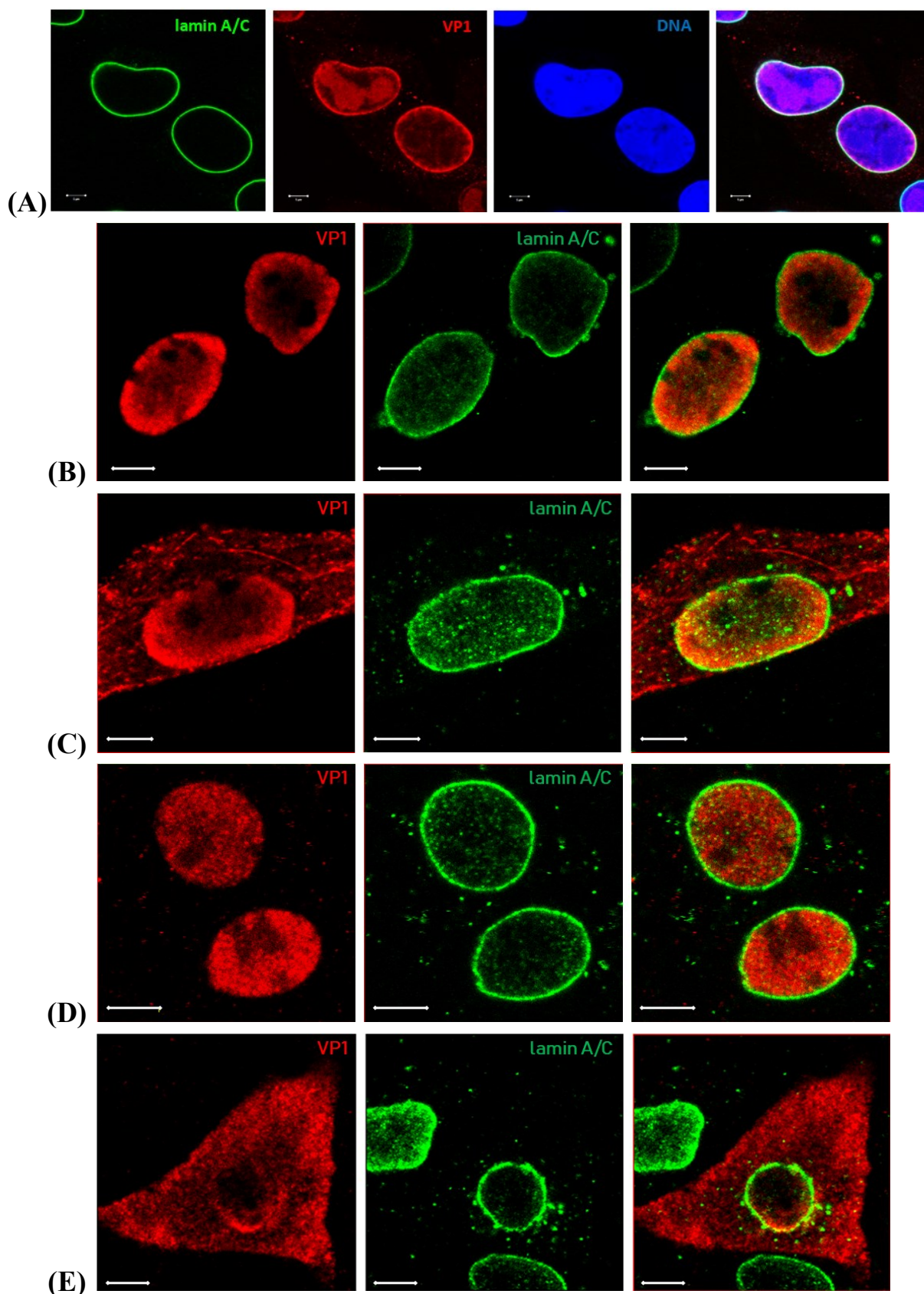
Stejně jako u myšího polyomaviru, tak i BK viru jsme hledali expresní vektor, který po transfekci zajistí stejnou lokalizaci proteinu VP1, jakou můžeme pozorovat v infikovaných buňkách v pozdní fázi infekce. Testovali jsme 2 typy konstruktů, které jsou dostupné v naší laboratoři: plazmid pBKV VP1 (6444 bp) kódující BK virový hlavní kapsidový protein VP1 a konstrukt pwB2b (6756 bp) kódujícího BK virové kapsidové proteiny VP1 a VP2. Plazmidy byly izolovány a jejich integrita byla ověřena agarózovou elektroforézou (obr. 26).



Obr. 26 Elektroforetogram zobrazující plazmidy pBKV VP1 a pwB2b. Vzorky byly nanесeny v různých ředěních. Detekovali jsme cirkularizované formy plazmidové DNA. Plazmidy byly vizualizovány pomocí GelRed Nucleic Acid Stain. **M** – marker molekulových vah (bp); **1** – pBKV VP1 1 µg; **2** – pBKV VP1 0,2 µg; **3** – pBKV VP1 20 ng; **4** – pwB2b 1 µg; **5** – pwB2b 0,2 µg; **6** – pwB2b 20 ng.

Buňky RPTEC/hTERT1 byly transfekovány plazmidy pBKV VP1 nebo pwB2b. Buňky byly po 24 h fixovány a pomocí nepřímé imunofluorescence byl v buňkách vizualizován strukturní protein VP1 a lamin A/C. Protein lamin A/C byl označen proto, abychom dobře vizualizovali hranici buněčného jádra.

Na rozdíl od proteinu VP1 myšího viru jsme nepozorovali vliv exprese minoritního proteinu na lokalizaci proteinu VP1 v buňce. Po transfekci oběma typy plazmidů jsme pozorovali dva fenotypy lokalizace proteinu VP1. Prvním a majoritně se vyskytujícím se fenotypem byly buňky s proteinem VP1 lokalizovaným v jádře (obr. 27 B, C). Druhým, minoritně pozorovaným fenotypem, byly buňky s proteinem VP1 lokalizovaným jak v jádře, tak v cytoplasmě (obr. 27 D, E). Bohužel ani jeden konstrukt nezajišťoval podobnou lokalizaci proteinu VP1 jako v infikovaných buňkách (obr. 27 A). Zde se protein VP1 sice také vyskytuje hlavně v buněčném jádře, ale je lokalizován především pod jadernou laminou, případně tvoří klastry uvnitř jader. Na rozdíl od transfekovaných buněk, kde se protein VP1 nacházel v jádře spíše difúzně, nevykazoval specifickou lokalizaci uvnitř jádra. Proto jsme se rozhodli připravit konstrukt zajišťující expresi všech pozdních proteinů BK viru v buňce najednou.



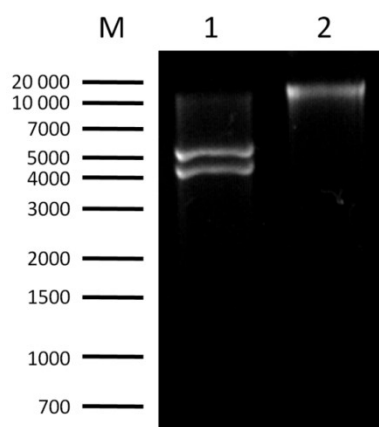
Obr. 27 Lokalizace hlavního kapsidového proteinu BKV VP1 a laminu A/C v buňkách linie RPTEC/hTERT1. (A) Buňky byly infikovány BKV (MOI = 5) a fixovány v pozdní fázi infekce 2 dpi. Protein VP1 (červeně) a lamin A/C (zeleně) byly značeny specifickými protilátkami. DNA byla vizualizována DAPI. Úsečka 5 μm. Obrázek poskytla K. Bruštíková (nepublikovaná data). (B-E) Buňky byly transfekovány pBKV VP1 nebo pWB2b a fixovány 24 hpt. Zobrazeny jsou (B) majoritní a (C) minoritní fenotypy po transfekci pBKV VP1 a (B) majoritní a (C) minoritní fenotypy po transfekci pWB2b. Proteiny VP1 (červeně) a lamin A/C (zeleně) byly označeny specifickými protilátkami. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 5 μm.

5.2.3. Konstrukce expresního vektoru pBKV-LATE

Jak bylo ukázáno již dříve, pro translokaci proteinu VP1 myšího polyomaviru do jádra je nezbytná přítomnost minoritních proteinů (Soldatova et al., 2018). Přítomnost minoritních proteinů a v případě BK viru i agnoproteinu (pozdní, nestrukturní protein) by mohla mít vliv také na interakce proteinu VP1 s buněčnými proteiny. Proto jsme se rozhodli připravit konstrukt zajišťující expresi všech pozdních proteinů BK viru v buňce najednou.

Konstrukt byl navržen tak, aby co nejblíže mimikoval situaci v infikované buňce. Pod kontrolu silného eukaryotického promotoru byla vložena celá pozdní oblast genomu BK viru a zároveň byla zachována místa pro sestřih. Předpokládali jsme, že tímto způsobem nejenom zajistíme expresi všech čtyř pozdních proteinů BK viru (VP1, VP2, VP3 a agnoproteinu), ale zároveň i to, že budou v buňce přítomny v poměru podobném jako v infikované buňce.

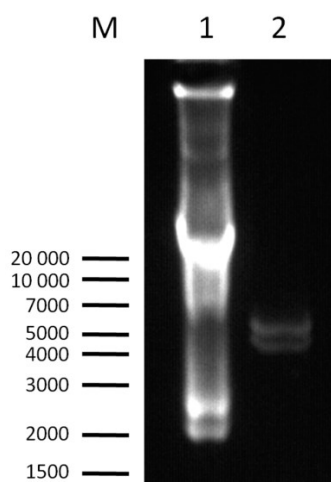
Pro namnožení fragmentu DNA obsahující pozdní oblast genomu jsme jako templát plánovali použít plazmid pBKV (34-2) obsahující celý genom BKV. Bohužel pozdní oblast BKV genomu je v tomto plazmidu přerušena sekvencí bakteriálního vektoru, proto jsme nejprve museli připravit intaktní virový genom. Plazmid byl z toho důvodu štěpen restrikční endonukleázou BamHI, čímž jsme dosáhli vyštěpení plazmidové kostry (4,3 kbp) a virového genomu (5,1 kbp). Úspěšnost štěpení byla ověřena pomocí agarové DNA elektroforézy (obr. 28). Dle očekávání jsme detekovali 2 fragmenty o velikosti 5,1 kbp a 4,3 kbp.



Obr. 28 Elektroforetogram zobrazující fragmenty vzniklé po restrikčním štěpení vektoru pBKV (34-2) restriktaázou BamHI. Předpokládaná velikost fragmentů byla 5,1 a 4,3 kbp. Vizualizace fragmentů byla provedena pomocí GelRed Nucleic Acid Stain. **M** – marker molekulových vah (bp); **1** – štěpený plazmid; **2** – neštěpený plazmid.

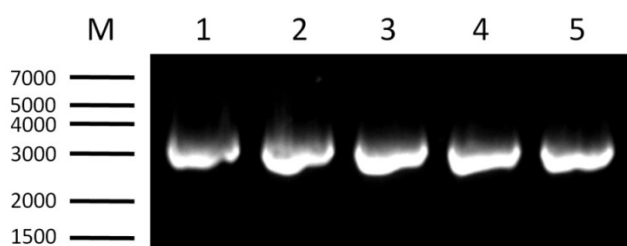
Štěpená DNA byla přečištěna srážením a následně byly fragmenty DNA ligovány tak, aby se upřednostnila intramolekulární ligace molekuly před ligací konců dvou různých linearizovaných genomů a opětovnému vzniku původního vektoru. Ligační směs byla koncentrována a přečištěna srážením a úspěšnost ligace byla ověřena na agarové DNA

elektroforéze (obr. 29). Na elektroforetogramu můžeme pozorovat několik produktů ligační reakce. Jedná se hlavně o intramolekulárně ligovaný genom BKV intramolekulárně ligovaný bakteriální vektor (velikost fragmentu cca 2500 bp) a širokou škálu násobně ligovaných i neligovaných genomů, vektorů a jejich kombinací. Cirkularizované genomy byly použity jako templát pro PCR reakci.



Obr. 29 Elektroforetogram zobrazující produkty ligace štěpeného plazmidu pBKV (34-2). Byla pozorována řada produktů ligační reakce včetně intramolekulárně ligovaného genomu BKV, intramolekulárně ligovaného bakteriálního vektoru (cca 2500 bp) a široká škála násobně ligovaných i neligovaných genomů, vektorů a jejich kombinací. Vizualizace fragmentů byla provedena pomocí GelRed Nucleic Acid Stain. **M** – marker molekulových vah (bp); **1** – ligovaný plazmid; **2** – štěpený plazmid.

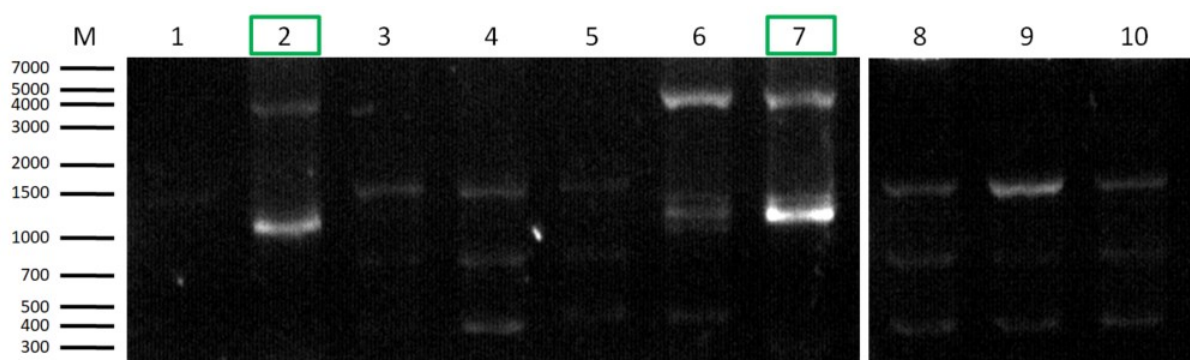
Pozdní oblast genomu BK viru (nukleotidy 314 – 2724, dle číslování BKV genomu) byla amplifikována pomocí PCR. Úspěšnost amplifikace byla ověřena na agarózové DNA elektroforéze (obr. 30). Předpokládaná velikost fragmentů činila 2410 bp.



Obr. 30 Elektroforetogram zobrazující produkty amplifikace pozdní oblasti BKV genomu metodou PCR. Předpokládaná velikost amplikonů pozdní oblasti genomu BK viru činila 2724 bp. DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí GelRed Nucleic Acid Stain. **M** – marker molekulových vah (bp); **1-5** jednotlivé PCR reakce.

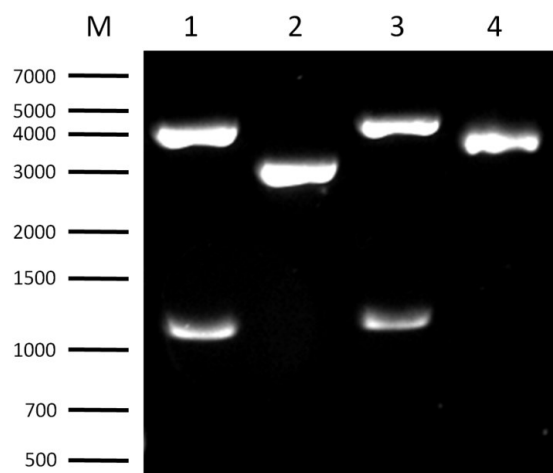
DNA amplikony z PCR reakcí jsme purifikovali pomocí komerční soupravy High Pure Purification Kit (Roche). Purifikovaný amplifikovaný fragment jsme pomocí komerční soupravy pro TOPO® klonování pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, with One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific) vložili *in vitro* do vektoru pENTR-D-TOPO za vzniku donorového vektoru pENTR-BKV-LATE. Vektorem pENTR-BKV-

LATE jsme transformovali bakterie a transformanty následně selektovali na základě kanamycinové rezistence. 10 kolonií obsahujících pENTR-BKV-LATE jsme přeočkovali do mikrozkupek a po 20 h inkubaci jsme z nich izolovali plazmidovou DNA pomocí komerční soupravy GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Izolovanou plazmidovou DNA jsme štěpili současně restriktázami EcoRI a EcoRV a následně jsme analyzovali velikost naštěpených fragmentů na agarózové DNA elektroforéze (obr. 31). V případě, že byly detekovány fragmenty o velikosti 3868 bp a 1112 bp, pozdní oblast byla do plazmidu vložena. Pokud jsme detekovali fragmenty o velikosti 3212 bp a 1768 bp, zaklonování pozdní oblasti neproběhlo. I když došlo pouze k částečnému naštěpení plazmidu, jako pozitivní se jevíly kolonie 2 a 7.



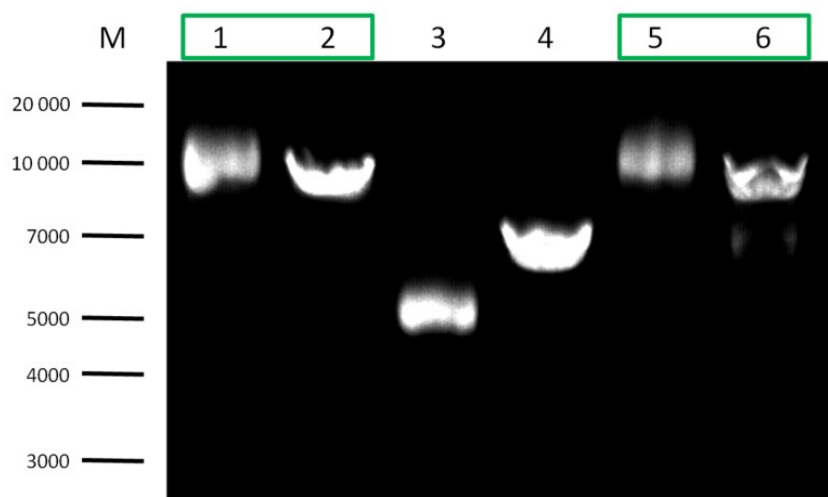
Obr. 31 Elektroforetogramy plazmidů pENTR-BKV-LATE vyizolovaných minipreparací a štěpených restriktázami EcoRV a EcoRI. Předpokládaná velikost produktů štěpení u vektorů se správně vloženým inzertem byla 3868 bp a 1112 bp. Zeleně označeny pozitivní kolonie. DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí GelRed Nucleic Acid Stain. **M** – marker molekulových vah (bp); **1-10** – kolonie 1-10.

Z vybraných kolonií byly opět izolovány vektory, opětovně ověřeny štěpením restriktázními endonukleázami EcoRI a EcoRV a výsledek restrikce byl analyzován na agarózové DNA elektroforéze (obr. 32). Po restrikci plazmidů z obou kolonií jsme detekovali fragmenty o velikosti 3868 bp a 1112 bp, což ukazuje, že pozdní oblast genomu BK viru byla do plazmidu vložena. Přítomnost a celistvost vložené sekvence byla dále potvrzena sekvenací plazmidu.



Obr. 32 Elektroforetogramy plazmidů pENTR-BKV-LATE vyizolovaných minipreparací a štěpených restriktázami EcoRV a EcoRI. Předpokládaná velikost produktů štěpení u vektorů byla 3868 bp a 1112 bp. DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí GelRed Nucleic Acid Stain. **M** – marker molekulových vah (bp); **1** – kolonie 2, štěpený plazmid; **2** – kolonie 2, neštěpený plazmid; **3** – kolonie 7, štěpený plazmid; **4** – kolonie 7, neštěpený plazmid

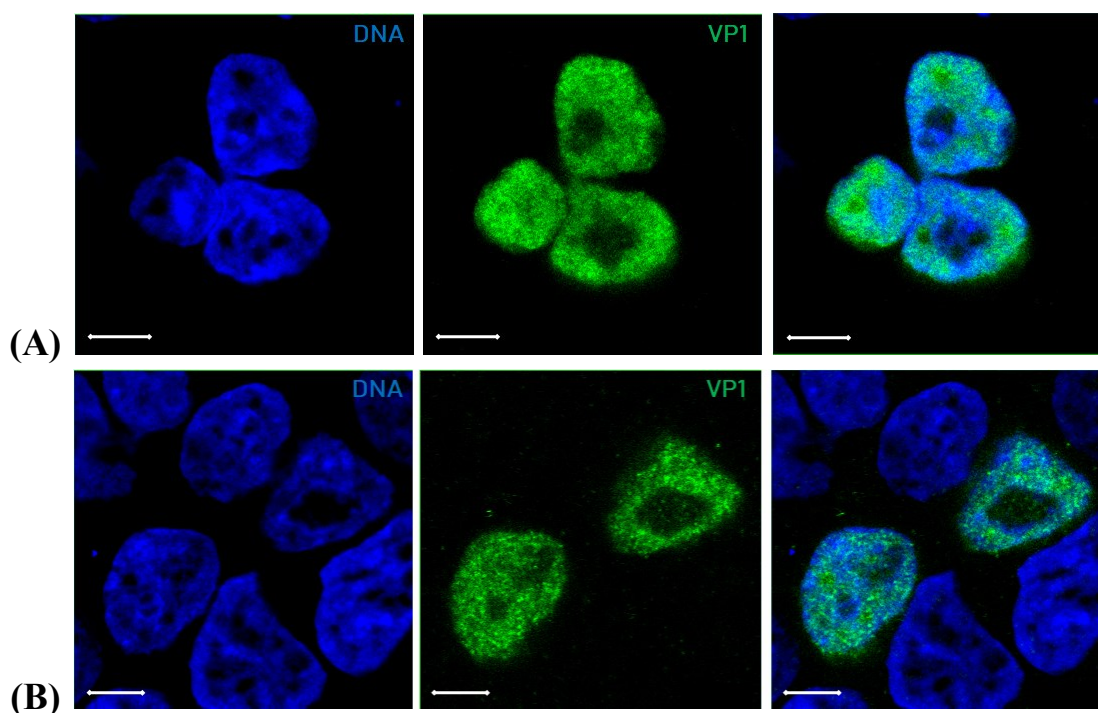
Poté byla provedena za použití soupravy Gateway™ LR Clonase™ II enzyme mix (Thermo Fisher Scientific) *in vitro* LR rekombinace mezi plazmidy pENTR-BKV-LATE (izolovaným z kolonie 2) a cílovým vektorem pEF-DEST 51. Pozdní oblast BKV z pENTR-BKV-LATE jsme tímto způsobem vložili pod kontrolu silného eukaryotického promotoru EF1, který je součástí vektoru pEF-DEST 51. Zároveň byla tímto z pEF-DEST 51 vyštěpěna sekvence kódující gen pro chloramfenikolovou rezistenci a gen *ccdB* (inhibitor gyrázy). Výsledný produkt, plazmid pEF-BKV-LATE, měl zachovanou pouze rezistenci k ampicilinu (lokalizovaná mimo cílové místo rekombinace) a postrádal rezistenci k chloramfenikolu. LR rekombinační směsí jsme transformovali bakterie, které byly následně selektovány na plotnách s ampicilinem. Přítomnost plazmidu pEF-BKV-LATE v selektovaných bakteriích byla dále ověřena jejich neschopností růstu na plotnách s ampicilinem a chloramfenikolem. Z 3 kolonií rostoucích na miskách s ampicilinem, ale neschopných růstu za přítomnosti chloramfenikolu, byla poté izolována plazmidová DNA a přítomnost sekvence pozdní oblasti BKV genomu byla analyzována štěpením restriktázou KpnI. V případě, že byla do plazmidu vložena pozdní oblast genomu, došlo k linearizaci vektoru a byl detekován fragment o velikosti 8500 bp. Plazmid pEF-DEST 51 cílovou sekvencí pro restriktázu KpnI neobsahuje, pokud tedy nedošlo k vložení sekvence pozdní oblasti genomu, k naštěpení plazmidu nedošlo. I když došlo ke štěpení všech testovaných plazmidů, u kolonie 2 jsme detekovali fragment o vyšší mobilitě, než jsme předpokládali (obr. 33). Proto jsme dále pracovali s plazmidy izolovanými z kolonie 1 a 3.



Obr. 33 Elektroforetogramy plazmidů pEF-BKV-LATE štěpených restriktázou KpnI. Předpokládaná velikost linearizovaného plazmidu s vloženou pozdní oblastí BKV byla 8500 bp. Zeleně označeny vybrané kolonie. DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí GelRed Nucleic Acid Stain. **M** – marker molekulových vah (bp); **1** – kolonie 1, štěpený plazmid; **2** – kolonie 1, neštěpený plazmid; **3** – kolonie 2, štěpený plazmid; **4** – kolonie 2, neštěpený plazmid; **5** – kolonie 3, štěpený plazmid; **6** – kolonie 3, neštěpený plazmid.

5.5.4. Ověření exprese proteinu VP1 z plazmidu pEF-BKV-LATE v savčích buňkách

Exprese proteinu VP1 z připravených plazmidů byla testována metodou nepřímé imunofluorescence. Plazmidy pEF BKV-LATE izolované z kolonie 1 a 3 byly transfekovány do savčí buněčné linie HEK 293 pomocí transfekčního roztoku TurboFect. Buňky byly fixovány 24 hpt a protein VP1 byl označen specifickou protilátkou. K expresi proteinu VP1 docházelo z plazmidů izolovaných z obou kolonií. Protein VP1 vykazoval jadernou lokalizaci (obr. 34). Po ověření exprese dalších pozdních proteinů (minoritních VP2 a VP3 a agnoproteinu) bude expresní plazmid použit ke studiu interakcí hlavního kapsidového proteinu VP1 s jadernými proteiny.



Obr. 34 Detekce proteinu hlavního kapsidového proteinu VP1 BKV v buňkách HEK 293. Buňky byly transfekovány plazmidy pEF BKV-LATE izolovaných z kolonie (A) 1 a (B) 3, fixovány 24 hpt. Protein VP1 (zeleně) byl značen specifickou protilátkou. DNA byla označena DAPI. Ukázány jsou vybrané konfokální řezy. Úsečka 5 μm .

6. Diskuze

Jaderná lamina představuje fyzickou bariéru pro vstup virů do jádra v časných fázích infekce i pro transport virových částic z jádra do cytoplazmy v pozdních fázích infekce a tím pádem i jednu z bariér při pohybu virionu ven z buňky v závěrečných fázích infekce. Polyomaviry patří mezi DNA viry, které se replikují v jádře. Do jádra vstupuje genom polyomavirů jaderným pórem na základě NLS strukturních proteinů asociovaných s virovým genomem, avšak mechanismus úniku virionů ven z jádra nebyl dosud jednoznačně objasněn. Naše laboratoř se dlouhodobě věnuje studiu interakcí strukturních proteinů polyomavirů s buněčnými proteiny a strukturami. V této práci jsme se zaměřili na interakce virových strukturních proteinů s proteiny jaderné laminy v pozdní fázi infekce s cílem zjistit, jak virové strukturní proteiny mohou jadernou laminu ovlivňovat a potenciálně tak přispívat k uvolnění částic z jádra buňky.

Nejprve jsme určili lokalizaci proteinu VP1 v buňkách 3T6 infikovaných virem MPyV. Pozorovali jsme jadernou i cytoplazmatickou lokalizaci proteinu VP1, kdy v jádře protein VP1 vykazoval výraznou afinitu k jaderné lamině a nacházel převážně v její těsné blízkosti. Zároveň bylo možné pozorovat poruchy v barvení jaderné laminy, které jsme nedetekovali v buňkách kontrolních. Tyto poruchy v barvení mohou indikovat narušení jaderné laminy vznikající jako následek probíhající virové replikace a exprese virových proteinů v buňce. Je tomu tak například u herpesvirů, kdy virové kinázy nebo hostitelské kinázy rekrutované virovými proteiny fosforylují lamin A/C, čímž zvyšují jeho rozpustnost a depolymeraci laminové sítě (Reynolds et al., 2004). Zajímalo nás, jestli jsou tyto poruchy barvení indukovány přítomností strukturních proteinů v buňce, hlavně s ohledem na protein VP1. Proto jsme nejprve hledali expresní plazmid, který by zajistil optimální expresi a lokalizaci proteinu VP1 v transfekovaných buňkách. Protein VP1 vyžaduje pro vstup do jádra přítomnost alespoň jednoho z minoritních proteinů (Horníková et al., 2017; Soldatova et al., 2018). Nejjednodušší způsob, jak zajistit ko-expresi strukturních proteinů v buňce je ko-transfekcí dvou expresních plazmidů. Při ko-transfekci buněk konstrukty pVP1, kódujícím VP1, a pVP2, kódujícím protein VP2, jsme sice pozorovali jadernou lokalizaci proteinu VP1 i jeho lokalizaci do blízkosti laminy, ale i přesto jsme se rozhodli s těmito konstrukty nepokračovat. Důvodem byl právě problém ko-transfekce dvěma konstrukty. U individuálně exprimovaných minoritních proteinů byla prokázána jejich afinita k vnitrobuněčným membránám včetně jaderné membrány a nelze vyloučit ani jejich interakci s proteiny jaderné laminy (Huerfano et al., 2010). Navíc nelze zaručit, že všechny buňky budou transfekovány oběma konstrukty naráz a ve stejném poměru a že bude ve výsledku vznikat v buňce stejné množství proteinu VP1 i VP2. Heterogenní populace buněk by tak mohla způsobovat

zkreslení dat v navazujících analýzách. Nicméně se však potvrdila předchozí pozorování, že protein VP1 vyžaduje pro vstup do jádra alespoň jeden z minoritních proteinů (Horníková et al., 2017; Soldatova et al., 2018). Optimálním konstruktem pro studium interakcí strukturních proteinů se ukázal plazmid pMPyV LATE kódující celou pozdní oblast genomu MPyV. Dle našeho předpokladu mimikoval tento konstrukt v buňkách infekci nejpřesněji. Protein VP1 jsme pozorovali jak v cytoplazmě, tak i v jádře nahromaděný pod jadernou laminou a lamina vykazovala poruchy v barvení. Posledním testovaným konstruktem byl pMPyV mut3 VP1, který kóduje protein VP1 mutovaný v NLS (K6Q-S7R-G8R). Takto mutovaný protein VP1 do jádra vstupuje nezávisle na přítomnosti minoritních proteinů (Soldatova et al., 2018). Mutovaný protein VP1 jsme v transfekovaných buňkách pozorovali téměř výhradně v jádře, ale vyskytoval se zde převážně difúzně, a nikoliv v blízkosti jaderné laminy tak, jak by odpovídalo fenotypu infikovaných buněk. Lokalizace proteinu VP1 v buňkách infikovaných, exprimujících strukturní proteiny nebo VP1 mut3 protein byla dále potvrzena frakcionací. Zjistili jsme, že v jaderné frakci rozpustných proteinů, kde najdeme i rozpustné laminy A/C, se nachází u infikovaných buněk i u buněk transfekovaných konstrukty pMPyV LATE a pMPyV mut3 VP1 přibližně stejné množství proteinu VP1. Nelze však určit, zda zde protein VP1 asociuje s dalšími rozpustnými jadernými proteiny, či se vyskytuje volně. V infikovaných buňkách se pak největší množství proteinu VP1 nacházelo ve frakci nerozpustných buněčných proteinů. Tato frakce obsahuje hlavně polymery proteinů buněčného cytoskeletu včetně laminů. Přítomnost proteinu VP1 v této frakci naznačuje jeho pravděpodobnou interakci s buněčným cytoskeletem. Vzhledem k tomu, že při imunofluorescenčních analýzách infikovaných buněk jsme pozorovali protein VP1 v největší míře právě v jádře akumulovaný pod jadernou laminou, předpokládáme, že významný podíl proteinu VP1 z frakce nerozpustných buněčných proteinů je asociovaný právě se zesíťovanými jadernými laminy. Podobná distribuce proteinu VP1 byla zjištěna i u transfekovaných buněk exprimujících strukturní proteiny, i když ve frakci nerozpustných buněčných proteinů jsme detekovali přibližně o 20 % proteinu VP1 méně než v infikovaných buňkách. U buněk exprimujících VP1 mut3 se nejvíce proteinu VP1 vyskytovalo v cytoplazmě a v nerozpustné frakci se vyskytovalo nejméně proteinu VP1. Tato data naznačují, že pro kolokalizaci proteinu VP1 se strukturou jaderné laminy jsou pravděpodobně důležité dvě věci – probíhající replikace viru a přítomnost minoritních proteinů. Alespoň část kolokalizujícího VP1 by mohla být součástí replikačních center nebo center morfogeneze virionu. Tato centra by mohla být přichycena ke struktuře jaderného cytoskeletu a lokalizována do blízkosti laminy interakcí přes virový genom. Součástí jaderného cytoskeletu je i matrixový protein YY1 (Guo et al., 1995) a může se tak účastnit asociace specifických

DNA sekvencí k jadernému cytoskeletu. Zároveň protein YY1 váže jak DNA polyomavirového genomu (Gendron et al., 1996; Martelli et al., 1996), tak i protein VP1 (Palková et al., 2000). Tento protein by tak mohl zprostředkovávat interakci virového genomu s proteinem VP1 během morfogeneze virionu a zároveň „kotvit“ tento protein k jadernému cytoskeletu a zajistit tak lokalizaci blízko jaderné laminy. Dále se ukazuje, že pro lokalizaci proteinu VP1 do blízkosti jaderné laminy je důležitá přítomnost minoritních proteinů v buňce.

Minoritní proteiny mohou interakcí s proteinem VP1 měnit jeho konformaci, zpřístupňovat různé aminokyselinové zbytky proteinu VP1 pro posttranslační úpravy buněčnými enzymy (Li et al., 1995) a ovlivňují tak finální konformaci proteinu VP1 do stavu, který je nutný pro efektivní enkapsidaci genomu. Pokud je tato hypotéza platná, mohou být minoritní proteiny zodpovědné i za změnu konformace proteinu VP1 způsobem, který mu umožní interagovat s jadernou laminou.

U buněk transfekovaných konstruktem pMPyV mut3 VP1 jsme detekovali relativně velké množství proteinu VP1 v cytoplazmě. Otázkou je, jestli je tento protein akumulovaný VP1, který nebyl transportován do jádra nebo se jedná o protein, který unikl z jádra prostřednictvím fyzického rozrušení laminy nebo v důsledku arteficiálního uvolnění proteinu VP1 z jádra při frakcionaci buněk. Při fluorescenční analýze jsme nedetekovali zvýšené množství proteinu VP1 v cytosolu, ale pozorovali jsme nejvýraznější deformace laminy i značné poruchy v jejím barvení, což současně s vyšším výskytem proteinu VP1 v cytoplazmě může naznačovat vyšší křehkost jádra a jeho nižší mechanickou odolnost. Tyto skutečnosti jsme chtěli potvrdit následujícími experimenty.

Jako první jsme chtěli zjistit, zda exprese strukturních proteinů MPyV může mít vliv na množství laminu A/C a laminu B1 v buňce. Zatímco po transfekci buněk plazmidem pMPyV mut3 VP1 jsme nedetekovali žádný pokles hladiny laminu A/C v buňkách, v případě transfekce plazmidem pMPyV LATE jsme detekovali snížení množství laminu A/C v buňkách vůči negativní kontrole. Je možné, že při expresi všech strukturních proteinů jsou virové proteiny schopné indukovat degradaci laminu A/C. Degradace laminu A/C je však i jedním z markerů probíhající apoptózy (Mahajan et al., 2017). Kolegové z naší laboratoře již v minulosti prokázali cytotoxicitu samostatně exprimovaných minoritních proteinů MPyV, ačkoli v případě probíhající virové infekce přispívají minoritní proteiny k apoptóze buněk jen mírně (Huerfano et al., 2010). Avšak přítomnost minoritních proteinů může ovlivňovat pravděpodobně konformaci proteinu VP1 a jeho případné protein-proteinové interakce. V přítomnosti minoritních proteinů by pak mohl VP1 přímo interagovat se specifickou izoformou laminu A/C nebo se specifickými buněčnými proteiny a ať už přímo, či nepřímo iniciovat degradaci této izoformy laminu. Velmi zajímavé výsledky jsme pozorovali při

detekci množství laminu B1 v buňkách transfekovaných plazmidy pMPyV mut3 VP1 a pMPyV LATE. V případě transfekce konstrukty pMPyV mut3 VP1 i pMPyV LATE jsme pozorovali dvojnásobně zvýšené množství laminu B1 v buňkách oproti kontrole. Tato pozorování by se dala vysvětlit tím, že buňka v reakci na narušení stability jaderného obalu či dokonce v rámci některého mechanismu antivirové obrany zvýší expresi laminu B1, aby kompenzovala klesající množství laminu A/C. Pokud však virové proteiny přispívají k degradaci laminů, pravděpodobněji cílí právě na laminy A/C, jelikož tento typ laminů přispívá největší měrou k mechanické odolnosti a pevnosti jádra (Lammerding et al., 2006). Dalo by se tak dokonce usuzovat, že buňka zvyšuje expresi všech laminů, tedy laminů A/C i B, a pokles množství laminu A/C v buňce, který jsme pozorovali, se odehrává navzdory této zvýšené expresi laminů A/C. Znamenalo by to tedy velmi efektivní degradaci laminů indukovanou expresí virových proteinů.

Vzhledem k tumorogennímu potenciálu polyomavirů může být relevantní analyzovat i situaci v rakovinných buňkách. U rakovinných buněk byla prokázána zvýšená schopnost migrace při zvýšené expresi laminu B1 (Li et al., 2013). V případě laminu A je situace opačná, kdy migrace buněk je podpořena poklesem hladiny laminu A v buňce a její zvýšení migraci buněk inhibuje (Evangelisti et al., 2020; Reis-Sobreiro et al., 2018). Snížení poměru laminů A vůči laminům B pak v buňkách migraci akceleruje, ale zvyšuje se i riziko prasknutí jaderného obalu (Harada et al., 2014). Ukazuje se, že zvýšením množství laminů B dochází k rozrušení perinukleárního aktinového prstence, čímž je inhibována asociace aktinového cytoskeletu s jaderným obalem a zmírní se tak pohyby a deformace jádra způsobené pohybem buňky (Fracchia et al., 2020). Vzhledem k tomu, že situace v buňkách transfekovaných pMPyV LATE vcelku odpovídá pozorováním v rakovinných buňkách, bylo by zajímavé zaměřit se v dalším výzkumu na potenciální změny mobility transfekovaných, potažmo infikovaných buněk. Zároveň by bylo užitečné pokusit se vizualizovat aktinový cytoskelet a zjistit, zda zdvojnásobení množství laminu B1 má v buňkách za následek rozpad perinukleárního aktinového prstence a může mít potažmo vliv na motilitu buněk.

U herpesvirů byl popsán mechanismus rozrušení laminární sítě posttranslační fosforylací laminu A/C, která probíhá buď přímo prostřednictvím virovými kináz, nebo hostitelských kináz rekrutovaných virovými proteiny. Laminy A/C se tak stávají rozpustnějšími a laminové sítě rozvolněnějšími, což umožňuje virionům vazbu k vnitřní jaderné membráně a únik z jádra. Námi pozorovaná degradace laminu A/C může odrážet degradaci specifické izoformy tohoto laminu. Laminy A/C jsou modifikovány převážně fosforylacemi, přičemž různě fosforylované izoformy vykazují vyšší rozpustnost (Kochin et al., 2014). Zjistili jsme, že v transfekovaných buňkách se nachází v rozpustném stavu přes 90

% laminů A/C, zatímco v kontrolních buňkách činí toto množství jen 33,7 %. Mezi množství rozpustného laminu v buňkách transfekovaných pMPyV mut3 VP1 a pMPyV LATE byl pouze nepatrný rozdíl. Z těchto dat usuzujeme, že exprese virových proteinů v buňce ovlivňuje výrazně posttranslační modifikace laminu A/C a činí laminy rozpustnějšími. Zároveň je pro zvýšení rozpustnosti laminů A/C pravděpodobně stěžejní přítomnost pouze proteinu VP1. Současná exprese proteinu VP1 s minoritními proteiny měla na míru rozpustnosti laminů A/C již jen velmi nepatrný vliv, v kontrastu s výše popsáním výrazným vlivem minoritních proteinů na schopnost proteinu VP1 s laminy interagovat.

Tato data korespondují s naší hypotézou, že jádra (lamina) v buňkách exprimujících mut3 VP1 jsou křehčí. Předpokládáme, že protein VP1 může k jaderné lamině navádět kinázu (podobně jako u některých herpesvirů) např. PKC, která fosforyluje lamin A/C a způsobí rozrušení laminy. Proti tomuto rozrušení může působit komplex proteinu VP1 s minoritním proteinem, který naopak laminu stabilizuje a zabraňuje jejímu úplnému rozpadu. Mechanismus působení virových komplexů a kináz na laminu může být samozřejmě i opačný, kdy virové komplexy laminu stabilizují a proti této stabilizaci působí virem rekrutované kinázy, které ji fosforylací destabilizují. Jedním z těchto mechanismů by tak mohlo být zajištěno optimální narušení laminy pro únik virionů. Tuto teorii podporuje pozorování v buňkách transfekovaných pMPyV mut3 VP1. Tyto buňky vykazovaly při imunofluorescenčních analýzách nejvýraznější deformity ve srovnání s ostatními buňkami a data z frakcionace i imunofluorescenčních analýz naznačují, že VP1 protein není pravděpodobně schopen efektivně interagovat s polymerovanými laminy bez přítomnosti minoritních proteinů.

Vzhledem k dosaženým výsledkům jsme dále zkoumali, jaký vliv na lokalizaci proteinu VP1 a propustnost jádra má nepřítomnost laminu A/C v buňce. Jádra buněk LMNA -/- (buňky s deletovaným genem pro lamin A) mají sníženou mechanickou odolnost a laminy B tvoří v nepřítomnosti laminu A/C síť s většími „průsvity“ (Shimia et al., 2015). Zajímalo nás, zda po transfekci buněk LMNA -/- budeme pozorovat zvýšené množství proteinu VP1 v cytoplazmě, protože lamina bude představovat méně odolnou a snáz překonatelnou bariéru a zároveň, jestli bude protein VP1 interagovat s laminou, v tomto případě pouze s laminem B. Při imunofluorescenční analýze jsme ve srovnání s wt buňkami pozorovali intenzivnější kolokalizaci proteinu VP1 s laminem B1, poruchy barvení laminu a větší míru výskytu VP1 v nukleoplazmě. Zároveň se v nukleoplazmě i pod laminou vyskytoval protein VP1 hojně v drobných shlucích, které jsme pozorovali ve wt buňkách v mnohem menší míře. Tyto shluky mohou být agregáty proteinu VP1, který je exprimován, translatován a importován do jádra v nezměněném množství oproti wt buňkám, ale v jádře postrádá významného

interakčního partnera. To naznačuje roli laminu A/C jakožto „lešení“ pro procesy probíhající ve virové replikaci. Jelikož nám tyto výsledky neposkytly jednoznačnou odpověď ohledně „propustnosti“ jádra a předpokládané akumulace proteinu VP1 v cytoplazmě, rozhodli jsme se určit rozdíly v distribuci proteinu VP1 v LMNA $+/+$ a LMNA $-/-$ buňkách pomocí frakcionace proteinů.

Frakcionovali jsme infikované buňky, protože jsme předpokládali, že případné rozdíly v lokalizaci proteinu VP1 budou při infekci nejvýraznější. Dle předpokladu odpovídala distribuce proteinu VP1 v LMNA $+/+$ buňkách distribuci v infikovaných buňkách v předchozích experimentech. U buněk LMNA $-/-$ jsme pozorovali zvýšené množství proteinu VP1 v jaderné frakci, což potvrdilo naše pozorování zvýšené nukleoplazmatické lokalizace při imunofluorescenčních analýzách. Nejvíce proteinu VP1 se v LMNA $-/-$ buňkách nacházelo v cytoplazmatické frakci tak, jak jsme očekávali. Tím je podpořena naše hypotéza, že lamina slouží jako bariéra, kterou virus překonává na cestě do cytoplazmy, a pokud je její struktura prostupnější a rozvolněnější, virus se dostává ven z jádra snáze. Snížené množství proteinu VP1 v LMNA $-/-$ buňkách v nerozpustné frakci podporuje teorii o funkci laminu A/C jakožto „lešení“ pro tvorbu virových komplexů. Pokud toto „lešení“ odstraníme, protein VP1 se vyskytuje ve větší míře v cytoplazmě a rozpustné jaderné frakci. Zároveň tato pozorování naznačují i to, že protein VP1 interaguje pravděpodobně i s laminem B.

Do budoucna by bylo zajímavé se zaměřit také na roli laminu B v replikačním cyklu viru. Zjistit, zda se liší množství laminu B v infikovaných a neinfikovaných buňkách exprimujících či nikoliv lamin A/C. Získali bychom informace o tom, jestli se LMNA $-/-$ buňky „snaží“ kompenzovat absenci laminu A/C zvýšenou expresí laminů B a jak se situace mění či nemění v důsledku infekce. To by nám mohlo pomoci odpovědět na otázku, jak a zda jsou pro infekci důležité oba typy laminů. Zda je pro virovou replikaci nepřítomnost laminů A/C ve výsledku spíše výhodou či překážkou, by bylo možno určit prostřednictvím izolace viru ze supernatantů a buněčných lyzátů v pozdní fázi infekce a porovnáním množství izolovaných virových partikulí získaných z wt a LMNA $-/-$ buněk. Pokud je absence laminu A/C pro virus převážně výhodou, byla by pravděpodobně množství viru ve wt i LMNA $-/-$ inokulech srovnatelná. Pokud však virus využívá laminy A/C jako „lešení“ pro vznikající virové komplexy, produkce virových částic by byla pravděpodobně v LMNA $-/-$ buňkách snížena.

V druhé části této práce jsme optimalizovali metody pro práci s BK virem, kterému se naše laboratoř plánuje v budoucnu věnovat. Potřebovali jsme najít expresní vektor kódující BK virové proteiny, který bude v buňkách co nejpřesněji mimikovat infekci BK virem z hlediska lokalizace proteinu VP1. Při infekci buněk nacházíme protein VP1 téměř výhradně

v jádře, kde kolokalizuje s jadernou laminou či tvoří klastry. Nejprve jsme určili optimální metodu nukleofekce pro buňky linie RPTEC/hTERT1 a transfekovali buňky plazmidem pBKV VP1 nebo pwB2b a imunofluorescenčně analyzovali. Při samostatné expresi proteinu VP1 z plazmidu pBKV VP1 i při současné expresi proteinu VP1 a VP2 z plazmidu pwB2b jsme pozorovali shodné fenotypy. Majoritním fenotypem byly buňky s proteinem VP1 lokalizovaným difúzně v jádře a minoritně pozorovaným fenotypem byly buňky s proteinem VP1 lokalizovaným jak v jádře, tak v cytoplazmě. Zjistili jsme, že NLS BK virového proteinu VP1 je dostatečný pro vstup do jádra, protože na rozdíl od proteinu VP1 myšího polyomaviru vstupuje protein VP1 do jádra i v pBKV VP1 transfekovaných buňkách. I přes jadernou lokalizaci proteinu VP1 v transfekovaných buňkách však fenotypy neodpovídaly fenotypům infikovaných buněk. Usoudili jsme, že za téměř výhradně jadernou lokalizaci proteinu VP1 v jádře v infikovaných buňkách může být zodpovědný ještě další BK virový pozdní protein, nestrukturní agnoprotein. Agnoprotein se podílí na regulaci virové transkripce a replikace a je nezbytným proteinem pro dokončení produktivní infekce. Byla prokázána jeho interakce s proteinem VP1 a účastní se skládání virionů v jádře. V infikovaných buňkách je lokalizován v perinukleárním prostoru, kde nacházíme nahromaděný i protein VP1 (Saribas et al., 2016). Proto jsme zkonstruovali expresní vektor pEF BKV-LATE, který kóduje celou pozdní oblast genomu BKV. Po transfekci buněk konstruktem pEF BKV-LATE jsme provedli imunofluorescenční analýzu a detekovali protein VP1 v jádře. Tím jsme ověřili expresi proteinu VP1 z našeho konstruktů a potvrdili naši hypotézu, že tento vektor bude napodobovat infekci přesněji, než konstrukty pBKV VP1 a pwB2b. Výhradně jaderná lokalizace proteinu VP1 v pEF BKV-LATE transfekovaných buňkách na rozdíl od buněk transfekovaných pBKV VP1 a pwB2b rovněž naznačuje roli agnoproteinu. Pro podpoření hypotézy, že za kolokalizaci proteinu VP1 s jadernou laminou je zodpovědný agnoprotein, by bylo dobré imunofluorescenčně ověřit kolokalizaci agnoproteinu a proteinu VP1 v jádře. Dále by bylo užitečné určit distribuci proteinu VP1 v infikovaných a v konstrukty pwB2b a pEF BKV-LATE transfekovaných buňkách, abychom objasnili roli agnoproteinu a virové replikace v distribuci proteinu VP1 v buňce. V následujících experimentech by pak byla analyzována role laminů a BK virových strukturních proteinů a agnoproteinu v replikačním cyklu BK viru obdobným způsobem, jako jsme ji analyzovali v případě MPyV. Získané poznatky o významu jaderné laminy by mohly objasnit některé kroky v replikaci polyomavirů a do budoucna by mohly pomoci ve vývoji cílených antivirových účinných v boji s lidskými polyomaviry.

7. Závěr

Výsledky této diplomové práce se dají shrnout do těchto bodů:

Myší polyomavirus

- **Nalezli jsme expresní vektor, který po transfekci do buněk zajistil stejnou lokalizaci proteinu VP1, jakou jsme pozorovali v infikovaných buňkách v pozdní fázi infekce.**
 - V infikovaných buňkách byl protein VP1 lokalizován v cytoplasmě a v jádře pod jadernou laminou, která vykazovala defekty v barvení naznačující její narušení. Odpovídající fenotyp jsme nacházeli u buněk exprimujících všechny strukturní proteiny (plazmid pMPyV LATE). Po transfekci buněk plazmidem pMPyV mut3 VP1 se protein VP1 nacházel rozptýlen v nukleoplasmě a ačkoli nevykazoval výraznou lokalizaci pod jadernou laminou, v buňkách jsme pozorovali defekty barvení a „zkroucení“ laminy. Tato pozorování naznačují vliv exprese strukturních proteinů na stav jaderné laminy, a proto jsme pro další experimenty použili i plazmid pMPyV mut3 VP1.
- **Určili jsme množství proteinu VP1 v proteinových frakcích buněk po infekci a po transfekci.**
 - Po infekci i transfekci buněk plazmidem pMPyV LATE a pMPyV mut3 jsme v jaderné frakci rozpustných proteinů detekovali přibližně stejné množství proteinu VP1. V infikovaných buňkách a buňkách transfekovaných pMPyV LATE se největší množství proteinu VP1 nacházelo ve frakci nerozpustných proteinů. V buňkách transfekovaných plazmidem pMPyV mut3 VP1 se nejvíce proteinu VP1 vyskytovalo v cytoplazmatické frakci. Tato data potvrdila naše výsledky z imunofluorescenční studie, že nejpodobnější jsou si fenotypy infikovaných buněk a buněk transfekovaných pMPyV LATE.
- **Otestovali jsme vliv exprese strukturních proteinů na množství laminu A/C a laminu B1 v buňce.**
 - Po transfekci buněk konstruktem pMPyV LATE klesalo vůči kontrole relativní množství laminu A/C. U buněk transfekovaných konstruktem pMPyV mut3 VP1 k takové změně nedocházelo. Relativní množství laminu B1 vůči kontrole vzrostlo po transfekci oběma konstrukty pMPyV mut3 VP1 i pMPyV LATE.
- **Ověřili jsme vliv exprese strukturních proteinů na rozpustnost laminu A/C v buňce.**

- Po transfekci buněk plazmidem pMPyV LATE nebo plazmidem pMPyV mut3 VP1 vzrostla rozpustnost laminu A/C o cca 60 % oproti kontrolním buňkám. Expresi strukturních proteinů MPyV tedy pravděpodobně významně ovlivňuje rozpustnost laminu A/C.
- **Porovnali lokalizaci proteinu VP1 v buňkách s deletovaným genem pro lamin A s normálními buňkami.**
 - Lokalizace proteinu VP1 byla oproti wt buňkám v LMNA -/- buňkách posílena v nukleoplazmě a zároveň protein VP1 výrazně kolokalizoval s laminem B.

BK virus

- **Optimalizovali jsme metodu transfekce savčích buněk RPTEC/hTERT1 nukleofekcí.**
- **Určili jsme lokalizaci proteinu VP1 v buňkách transfekovaných pBKV VP1 a pwB2b porovnali ji s lokalizací proteinu VP1 v infikovaných buňkách.**
 - Po transfekci konstruktem pBKV VP1 i konstruktem pwB2b jsme pozorovali stejné fenotypy buněk vzhledem k lokalizaci VP1. Majoritním fenotypem byly buňky s proteinem VP1 lokalizovaným rozptýleně v jádře a minoritním fenotypem byly buňky s proteinem VP1 lokalizovaným jak v jádře, tak v cytoplazmě. Ani jeden z těchto fenotypů neodpovídal situaci v infikovaných buňkách, kdy lokalizace VP1 je jaderná s nahromaděným proteinem VP1 pod jadernou laminou. Proto jsme se rozhodli zkonstruovat expresní vektor obsahující celou pozdní oblast genomu BK viru.
- **Zkonstruovali jsme expresní vektor pEF-BKV-LATE obsahující celou pozdní oblast genomu BKV Dunlop2 strain a ukázali jsme, že z tohoto plazmidu dochází k expresi proteinu VP1.**

8. Zdroje

- Aaronson, R. P., Blobel, G.** (1975). Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 1007–1011.
- Adam, S. A., Butin-Israeli, V., Cleland, M. M., Shimi, T., Goldman, R. D.** (2013). Disruption of lamin B1 and lamin B2 processing and localization by farnesyltransferase inhibitors. *Nucleus* 4, 142–150.
- Allison, A. C., Black, P. H.** (1967). Lysosomal changes in lytic and nonlytic infections with the simian vacuolating virus (SV40). *Journal of the National Cancer Institute* 39, 775–787.
- Alwine, J. C., Reed, S. I., Stark, G. R.** (1977). Characterization of the autoregulation of simian virus 40 gene A. *Journal of Virology* 24, 22–27.
- *An, P., Robles, M. T. S., Pipas, J. M.** (2012). Large T antigens of polyomaviruses: Amazing molecular machines. *Annual Review of Microbiology* 66, 213–236.
- Anderson, H. A., Chen, Y., Norkin, L. C.** (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular Biology of the Cell* 7, 1825–1834.
- Barouch, D. H., Harrison, S. C.** (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of Virology* 68, 3982–3989.
- Becker, M., Dominguez, M., Greune, L., Soria-Martinez, L., Pfeiderer, M. M., Schowalter, R., Buck, C. B., Blaum, B. S., Schmidt, M. A., Schelhaasa, M.** (2019). Infectious entry of Merkel cell polyomavirus Miriam. *Journal of Virology* 93, 1–21.
- Bennett, S. M., Jiang, M., Imperiale, M. J.** (2013). Role of cell-type-specific endoplasmic reticulum-associated degradation in polyomavirus trafficking. *Journal of Virology* 87, 8843–8852.
- Bennett, Shauna M., Zhao, L., Bosard, C., Imperiale, M. J.** (2015). Role of a nuclear localization signal on the minor capsid Proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology* 474, 110–116.
- Berger, H., Wintersberger, E.** (1986). Polyomavirus small T antigen enhances replication of viral genomes in 3T6 mouse fibroblasts. *Journal of Virology* 60, 768–770.
- Bolen, J. B., Anders, D. G., Trempey, J., Consigli, R. A.** (1981). Differences in the subpopulations of the structural proteins of polyoma virions and capsids: Biological functions of the multiple VP1 species. *Journal of Virology* 37, 80–91.
- Breau, W. C., Atwood, W. J., Norkin, L. C.** (1992). Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *Journal of Virology* 66, 2037–2045.
- Broers, J. L. V., Machiels, B. M., Van Eys, G. J. J. M., Kuijpers, H. J. H., Manders, E. M. M., Van Driel, R., Ramaekers, F. C. S.** (1999). Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *Journal of Cell Science* 112, 3463–3475.
- Broers, J. L. V., Peeters, E. A. G., Kuijpers, H. J. H., Endert, J., Bouten, C. V. C., Oomens, C. W. J., Baaijens, F. P. T., Ramaekers, F. C. S.** (2004). Decreased mechanical stiffness in LMNA/-cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: Implications for the development of laminopathies. *Human Molecular Genetics* 13, 2567–2580.
- Buck, C. B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E. M., Tisza, M. J., An, P., Katz, J. P., Pipas, J. M., McBride, A. A., Camus, A. C., McDermott, A. J., Dill, J. A., Delwart, E., Ng, T. F. F., Farkas, K., Austin, C., Kraberger, S., Davison, W., Pastrana, D. V., Varsani, A.** (2016). The ancient evolutionary history of polyomaviruses. *PLoS Pathogens* 12, 1–26.
- Burkert, O., Kreßner, S., Sinn, L., Giese, S., Simon, C., Lilie, H.** (2014). Biophysical characterization of polyomavirus minor capsid proteins. *Biological Chemistry* 395, 871–880.
- Butin-Israeli, V., Ben-nun-Shaul, O., Kopatz, I., Adam, S. A., Shimi, T., Goldman, R. D., Oppenheim, A.** (2011). Simian virus 40 induces lamin A/C fluctuations and nuclear envelope deformation during cell entry. *Nucleus* 2, 320–330.

- Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S., Consigli, R. A.** (1994). Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *Journal of Virology* 68, 7609–7613.
- Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R., Ehlers, B.** (2016). A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology* 161, 1739–1750.
- Carbone, M., Ascione, G., Chichiarelli, S., Garcia, M. I., Eufemi, M., Amati, P.** (2004). Chromosome-protein interactions in polyomavirus virions. *Journal of Virology* 78, 513–519.
- Carbone, M., Reale, A., Di Sauro, A., Sthandier, O., Garcia, M. I., Maione, R., Caiafa, P., Amati, P.** (2006). PARP-1 interaction with VP1 capsid protein regulates polyomavirus early gene expression. *Journal of Molecular Biology* 363, 773–785.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M.I.** (2003). $\alpha\beta 1$ integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *Journal of Virology* 77, 3913–3921.
- Champion, L., Linder, M. I., Kutay, U.** (2017). Cellular reorganization during mitotic entry. *Trends in Cell Biology* 27, 26–41.
- Chang, D., Haynes, J. I., Brady, J. N., Consigli, R. A.** (1992). Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191, 978–983.
- Chen, L., Fluck, M. M.** (2001). Role of middle T-small T in the lytic cycle of polyomavirus: Control of the early-to-late transcriptional switch and viral DNA replication. *Journal of Virology* 75, 8380–8389.
- Chen, P. L., Hsu, P. H., Fang, C. Y., Chang, C. F., Ou, W. C., Wang, M., Chang, D.** (2011). Phosphorylation of Ser-80 of VP1 and Ser-254 of VP2 is essential for human BK virus propagation in tissue culture. *Journal of General Virology* 92, 2637–2645.
- Chen, X. S., Stehle, T., Harrison, S. C.** (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO Journal* 17, 3233–3240.
- Cho, S., Vashisth, M., Abbas, A., Majkut, S., Vogel, K., Xia, Y., Ivanovska, I. L., Irianto, J., Tewari, M., Zhu, K., Tichy, E. D., Mourkioti, F., Tang, H. Y., Greenberg, R. A., Prosser, B. L., Discher, D. E.** (2019). Mechanosensing by the lamina protects against nuclear rupture, DNA damage, and cell cycle arrest. *Developmental Cell* 49, 920–935.
- Chow, M., Newman, J. F. E., Filman, D., Hogle, J. M., Rowlands, D. J., Brown, F.** (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 327, 482–486.
- Chromy, L. R., Pipas, J. M., Garcea, R. L.** (2003). Chaperone-mediated in vitro assembly of polyomavirus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10477–10482.
- *Cibulka, J., Fraiberk, M., Forstova, J.** (2012). Nuclear actin and lamins in viral infections. *Viruses* 4, 325–347.
- Clark, B., Desselberger, U.** (1988). Myristylation of rotavirus protein. *Journal of General Virology* 69, 2681–2686.
- Clayson, E. T., Brando, L. V, Compans, R. W.** (1989). Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *Journal of Virology* 63, 2278–2288.
- Cohen, S., Marr, A. K., Garcin, P., Pante, N.** (2011). Nuclear envelope disruption involving host caspases plays a role in the parvovirus replication cycle. *Journal of Virology*, 85(10), 4863–4874.
- Cohen, Sarah, Behzad, A. R., Carroll, J. B., Panté, N.** (2006). Parvoviral nuclear import: Bypassing the host nuclear-transport machinery. *Journal of General Virology* 87, 3209–3213.
- Collas, P., Thompson, L., Fields, A. P., Poccia, D. L., Courvalin, J. C.** (1997). Protein kinase C-mediated interphase lamin B phosphorylation and solubilization. *Journal of Biological Chemistry* 272, 21274–21280.

Corne, T. D. J., Sieprath, T., Vandenbussche, J., Mohammed, D., te Lindert, M., Gevaert, K., Gabriele, S., Wolf, K., De Vos, W. H. (2017). Deregulation of focal adhesion formation and cytoskeletal tension due to loss of A-type lamins. *Cell Adhesion and Migration* 11, 447–463.

Cripe, T. P., Delos, S. E., Estes, P. A., Garcea, R. L. (1995). In vivo and in vitro association of Hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *Journal of Virology* 69, 7807–7813.

Dailey, L., Basilico, C. (1985). Sequences in the polyomavirus DNA regulatory region involved in viral DNA replication and early gene expression. *Journal of Virology* 54, 739–749.

Damm, E. M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., Helenius, A. (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: Entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *Journal of Cell Biology* 168, 477–488.

Daniels, R., Rusan, N. M., Wadsworth, P., Hebert, D. N. (2006). SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: Implications for DNA translocation out of the ER. *Molecular Cell* 24, 955–966.

*de Leeuw, R., Gruenbaum, Y., Medalia, O. (2018). Nuclear lamins: Thin filaments with major functions. *Trends in Cell Biology* 28, 34–45.

Dechat, T., Shimi, T., Adam, S. A., Rusinol, A. E., Andres, D. A., Spielmann, H. P., Sinensky, M. S., Goldman, R. D. (2007). Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4955–4960.

Dhe-Paganon, S., Werner, E. D., Chi, Y. I., Shoelson, S. E. (2002). Structure of the globular tail of nuclear lamin. *Journal of Biological Chemistry* 277, 17381–17384.

Dilworth, S. M., Griffin, B. E. (1982). Monoclonal antibodies against polyoma virus tumor antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 1059–1063.

*Dittmer, T., Misteli, T. (2011). The lamin protein family. *Genome Biology* 12, 222–236.

Dugan, A. S., Eash, S., Atwood, W. J. (2005). An N-linked glycoprotein with $\alpha(2,3)$ -linked sialic acid is a receptor for BK Virus. *Journal of Virology* 79, 14442–14445.

Eash, S., Querbes, W., Atwood, W. J. (2004). Infection of Vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Journal of Virology* 78, 11583–11590.

Eddy, B. E., Stewart, S. E. (1959). Characteristics of the SE polyoma virus. *American Journal of Public Health and Nation's Health* 49, 1486–1492.

Eggert, M., Radomski, N., Tripier, D., Traub, P., Jost, E. (1991). Identification of phosphorylation sites on murine nuclear lamin C by RP-HPLC and microsequencing. *FEBS Letters* 292, 205–209.

Engelsma, D., Valle, N., Fish, A., Salome, N., Almendral, J. M., Fornerod, M. (2008). A supraphysiological nuclear export signal is required for parvovirus nuclear export. *Molecular Biology of the Cell* 19, 2544–2552.

Erickson, K. D., Bouchet-Marquis, C., Heiser, K., Szomolanyi-Tsuda, E., Mishra, R., Lamothe, B., Hoenger, A., Garcea, R. L. (2012). Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells. *PLoS Pathogens* 8.

Evangelisti, C., Paganelli, F., Giuntini, G., Mattioli, E., Cappellini, A., Ramazzotti, G., Faenza, I., Maltarello, M. C., Martelli, A. M., Scotlandi, K., Chiarini, F., Lattanzi, G. (2020). Lamin A and prelamin A counteract migration of osteosarcoma cells. *Cells* 9, 774.

Fang, C. Y., Chen, H. Y., Wang, M., Chen, P. L., Chang, C. F., Chen, L. S., Shen, C. H., Ou, W. C., Tsai, M. D., Hsu, P. H., Chang, D. (2010). Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS. *Virology* 402, 164–176.

Fattaey, A. R., Consigli, R. A. (1989). Synthesis, posttranslational modifications, and nuclear transport of polyomavirus major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 63, 3168–3175.

Fawcett, D. W. (1966). On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *American Journal of Anatomy* 119, 129–145.

- *Feltkamp, M. C. W., Kazem, S., van der Meijden, E., Lauber, C., Gorbalenya, A. E.** (2013). From Stockholm to Malawi: Recent developments in studying human polyomaviruses. *Journal of General Virology* 94, 482–496.
- Feng, H., Chang, Y., Moore, P. S.** (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*.
- Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van De Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., Ysebaert, M.** (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273, 113–120.
- Fisher, D. Z., Chaudhary, N., Blobel, G.** (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 6450–6454.
- Forstová, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A. J., Dilworth, S. M., Beard, S., Griffin, B. E.** (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *Journal of Virology* 67, 1405–1413.
- Fracchia, A., Asraf, T., Salmon-Divon, M., Gerlitz, G.** (2020). Increased lamin B1 levels promote cell migration by altering perinuclear actin. Organization. *Cells* 9, 2161.
- Frearson, P. M., Crawford, L. V.** (1972). Polyoma virus basic proteins. *The Journal of General Virology* 14, 141–155.
- Frisque, R. J., Bream, G. L., Cannella, M. T.** (1984). Human polyomavirus JC virus genome. *Journal of Virology* 51, 458–469.
- *Gaillard, M. C., Reddy, K. L.** (2018). The nuclear lamina and genome organization. *Nuclear Architecture and Dynamics*, 321–343.
- Gant Luxton, G. W., Gomes, E. R., Folker, E. S., Worman, H. J., Gundersen, G. G.** (2011). TAN lines: A novel nuclear envelope structure involved in nuclear positioning. *Nucleus* 2, 173–181.
- Garcea, R. L., Ballmer-Hofer, K., Benjamin, T. L.** (1985). Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: Underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *Journal of Virology* 54, 311–316.
- Garcea, R. L., Salunke, D. M., Caspar, D. L. D.** (1987). Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid self-assembly in vitro. *Nature* 329, 86–87.
- Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V., Hulme, B.** (1971). New human Papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet* 297, 1253–1257.
- Gasparovic, M. L., Gee, G. V., Atwood, W. J.** (2006). JC virus minor capsid proteins VP2 and VP3 are essential for virus propagation. *Journal of Virology* 80, 10858–10861.
- Geiger, R., Andrichske, D., Friebe, S., Herzog, F., Luisoni, S., Heger, T., Helenius, A.** (2011). BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nature Cell Biology* 13, 1305–1314.
- Gendron, D., Delbecchi, L., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P.** (1996). An enhancer of recombination in polyomavirus DNA. *Journal of Virology* 70, 4748–4760.
- Gerace, L., Blum, A., Blobel, G.** (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. *Cell Biology*, 79(November).
- Gilbert, J., Ou, W., Silver, J., Benjamin, T.** (2006). Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. *Journal of Virology* 80, 10868–10870.
- Giorda, K. M., Raghava, S., Zhang, M. W., Hebert, D. N.** (2013). The viroporin activity of the minor structural proteins VP2 and VP3 is required for SV40 propagation. *Journal of Biological Chemistry* 288, 2510–2520.
- Good, P. J., Welch, R. C., Barkan, A., Somasekhar, M. B., Mertz, J. E.** (1988). Both VP2 and VP3 are synthesized from each of the alternative spliced late 19S RNA species of Simian virus 40. *Journal of Virology* 62, 944–953.

- Gross, L.** (1953). A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Experimental Biology and Medicine* 83, 414–421.
- Gruda, M. C., Zabolotny, J. M., Xiao, J. H., Davidson, I., Alwine, J. C.** (1993). Transcriptional activation by simian virus 40 large T antigen: Interactions with multiple components of the transcription complex. *Molecular and Cellular Biology* 13, 961–969.
- *Gruenbaum, Y., Foisner, R.** (2015). Lamins: Nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annual Review of Biochemistry* 84, 131–164.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., Eussen, B. H., De Klein, A., Wessels, L., De Laat, W., Van Steensel, B.** (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453, 948–951.
- Guo, B., Odgren, P. R., Van Wunen, A. J., Last, T. J., Nickerson, J., Penman, S., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S.** (1995). The nuclear matrix protein NMP-1 is the transcription factor YY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10526–10530.
- Handala, L., Blanchard, E., Raynal, P. I., Roingeard, P.** (2020). BK polyomavirus hijacks extracellular vesicles for en bloc transmission. *American Society for Microbiology* 94, 1–10.
- Hansen, J., Qing, K., Srivastava, A.** (2001). Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2. *Molecular Therapy* 4, 289–296.
- Harada, T., Swift, J., Irianto, J., Shin, J. W., Spinler, K. R., Athirasala, A., Diegmiller, R., Dingal, P. C. D. P., Ivanovska, I. L., Discher, D. E.** (2014). Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *Journal of Cell Biology* 204, 669–682.
- Harris, K. F., Christensen, J. B., Imperiale, M. J.** (1996). BK virus large T antigen: Interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *Journal of Virology* 70, 2378–2386.
- *Helle, F., Brochot, E., Handala, L., Martin, E., Castelain, S., Francois, C., Duverlie, G.** (2017). Biology of the BKPyV: An update. *Viruses* 9, 327.
- Henriksen, S., Hansen, T., Bruun, J. A., Rinaldo, C. H.** (2016). The presumed polyomavirus viroporin VP4 of simian virus 40 or human BK polyomavirus is not required for viral progeny release. *Journal of Virology* 90, 10398–10413.
- *Horn, H. F.** (2014). LINC Complex proteins in development and disease. *Current Topics in Developmental Biology* 109, 287–315.
- Horníková, L., Fraiberk, M., Man, P., Janovec, V., Forstová, J.** (2017). VP1, the major capsid protein of the mouse polyomavirus, binds microtubules, promotes their acetylation and blocks the host cell cycle. *FEBS Journal* 284, 301–323.
- Horníková, L., Man, P., Forstová, J.** (2011). Blue native protein electrophoresis for studies of mouse polyomavirus morphogenesis and interactions between the major capsid protein VP1 and cellular proteins. *Journal of Virological Methods* 178, 229–234.
- Horníková, L., Žíla, V., Španielová, H., Forstová, J.** (2015). Mouse polyomavirus: Propagation, purification, quantification, and storage. *Current Protocols in Microbiology*, 38.
- Houben, F., Willems, C. H. M. P., Declercq, I. L. J., Hochstenbach, K., Kamps, M. A., Snoeckx, L. H. E. H., Ramaekers, F. C. S., Broers, J. L. V.** (2009). Disturbed nuclear orientation and cellular migration in A-type lamin deficient cells. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* 1793, 312–324.
- Huber, M. D., Guan, T., Gerace, L.** (2009). Overlapping functions of nuclear envelope proteins NET25 (Lem2) and emerin in regulation of extracellular signal-regulated kinase signaling in myoblast differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 29, 5718–5728.
- Huerfano, S., Ryabchenko, B., Forstová, J.** (2013). Nucleofection of expression vectors induces a robust interferon response and inhibition of cell proliferation. *DNA and Cell Biology* 32, 467–479.

- Huérfino, S., Ryabchenko, B., Španielová, H., Forstová, J.** (2017). Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *FEBS Journal* 284, 883–902.
- Huerfano, S., Žila, V., Bouřa, E., Španielová, H., Štokrová, J., Forstová, J.** (2010). Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS Journal* 277, 1270–1283.
- Hurdiss, D. L., Morgan, E. L., Thompson, R. F., Prescott, E. L., Panou, M. M., Macdonald, A., Ranson, N. A.** (2016). New structural insights into the genome and minor capsid proteins of BK polyomavirus using cryo-electron microscopy. *Structure* 24, 528–536.
- Inoue, T., Tsai, B.** (2011). A large and intact viral particle penetrates the endoplasmic reticulum membrane to reach the cytosol. *PLoS Pathogens* 7.
- Ishii, N., Nakanishi, A., Yamada, M., Macalalad, M. H., Kasamatsu, H.** (1994). Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of Simian virus 40 structural proteins. *Journal of Virology* 68, 8209–8216.
- Ishizu, K.-I., Watanabe, H., Han, S.I., Kanesashi, S.-N., Hoque, M., Yajima, H., Kataoka, K., Handa, H.** (2001). Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of simian virus 40 VP1 capsid protein. *Journal of Virology* 75, 61–72.
- Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B., Imperiale, M. J.** (2009). Early events during BK virus entry and disassembly. *Journal of Virology* 83, 1350–1358.
- Kochin, V., Shimi, T., Torvaldson, E., Adam, S. A., Goldman, A., Pack, C. G., Melo-Cardenas, J., Imanishi, S. Y., Goldman, R. D., Eriksson, J. E.** (2014). Interphase phosphorylation of lamin A. *Journal of Cell Science* 127, 2683–2696.
- Kolb, T., Maaß, K., Hergt, M., Aebi, U., Herrmann, H.** (2011). Lamin A and lamin C form homodimers and coexist in higher complex forms both in the nucleoplasmic fraction and in the lamina of cultured human cells. *Nucleus* 2, 425–433.
- Komagome, R., Sawa, H., Suzuki, T., Suzuki, Y., Tanaka, S., Atwood, W. J., Nagashima, K.** (2002). Oligosaccharides as receptors for JC Virus. *Journal of Virology* 76, 12992–13000.
- Lake, R. S., Barban, S., Salzman, N. P.** (1973). Resolutions and identification of the core deoxynucleoproteins of the Simian virus 40. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 54, 640–647.
- Lammerding, J., Fong, L. G., Ji, J. Y., Reue, K., Stewart, C. L., Young, S. G., Lee, R. T.** (2006). Lamins a and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *Journal of Biological Chemistry* 281, 25768–25780.
- Lammerding, J., Stewart, C. L., Lee, R. T., Lammerding, J., Schulze, P. C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R. D., Stewart, C. L., Lee, R. T.** (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *The Journal of Clinical Investigation* 113, 370–378.
- Laskar, R., Jilani, M. G., Ali, S.** (2021). Implications of genome simple sequence repeats signature in 98 Polyomaviridae species. *Biotech* 11, 1–12.
- Leavitt, A. D., Roberts, T. M., Garcea, R. L.** (1985). Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* 260, 12803–12809.
- Lee, J. S. H., Hale, C. M., Panorchan, P., Khatau, S. B., George, J. P., Tseng, Y., Stewart, C. L., Hodzic, D., Wirtz, D.** (2007). Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration. *Biophysical Journal*, 93, 2542–2552.
- Lehner, C. F., Stick, R., Eppenberger, H. M., Migg, E. A.** (1987). Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. *Journal of Cell Biology* 105, 577–587.

- Li, L., Du, Y., Kong, X., Li, Z., Jia, Z., Cui, J., Gao, J., Wang, G., Xie, K. (2013). Lamin B1 is a novel therapeutic target of betulinic acid in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 19, 4651–4661.
- Li, M., Delos, S. E., Montross, L., Garcea, R. L. (1995). Polyomavirus VP1 phosphorylation: Coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in SF9 insect cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5992–5996.
- Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., Harrison, S. C. (1991). Structure of Simian virus 40 at 3.8 Å resolution. *Nature* 354, 278–284.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Štokrová, J., Forstová, J. (2006). Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *Journal of Virology* 80, 4610–4622.
- Lilley, B. N., Gilbert, J. M., Ploegh, H. L., Benjamin, T. L. (2006). Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *Journal of Virology* 80, 8739–8744.
- Liu, C. K., Wei, G., Atwood, W. J. (1998). Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal $\alpha(2-6)$ -linked sialic acids. *Journal of Virology* 72, 4643–4649.
- Low, J. A., Magnuson, B., Tsai, B., Imperiale, M. J. (2006). Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *Journal of Virology* 80, 1361–1366.
- Magnuson, B., Rainey, E. K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., Tsai, B. (2005). ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Molecular Cell* 20, 289–300.
- Mahajan, S., Thieme, D., Czugala, M., Kruse, F. E., Fuchsluger, T. A. (2017). Lamin cleavage: A reliable marker for studying staurosporine-induced apoptosis in corneal tissue. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 58, 5802–5809.
- Mannová, P., Liebl, D., Krauzewicz, N., Fejtová, A., Štokrová, J., Palková, Z., Griffin, B. E., Forstová, J. (2002). Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology* 83, 2309–2319.
- Mäntylä, E., Niskanen, E. A., Ihalainen, T. O., Vihinen-Ranta, M. (2015). Reorganization of nuclear pore complexes and the lamina in late-stage parvovirus infection. *Journal of Virology* 89, 11706–11710.
- Martelli, F., Iacobini, C., Caruso, M., Felsani, A. (1996). Characterization of two novel YY1 binding sites in the polyomavirus late promoter. *Journal of Virology* 70, 1433–1438.
- *Mayberry, C. L., Maginnis, M. S. (2020). Taking the scenic route: Polyomaviruses utilize multiple pathways to reach the same destination. *Viruses*, 12, 1168.
- Mayer, M., Dörries, K. (1991). Nucleotide sequence and genome organization of the murine polyomavirus, Kilham strain. *Virology* 181, 469–480.
- Milbradt, J., Hutterer, C., Bahsi, H., Wagner, S., Sonntag, E., Horn, A. H. C., Kaufer, B. B., Mori, Y., Sticht, H., Fossen, T., Marschall, M. (2016). The prolyl isomerase Pin1 promotes the herpesvirus-induced phosphorylation-dependent disassembly of the nuclear lamina required for nucleocytoplasmic egress. *PLoS Pathogens* 12, 1–30.
- Milbradt, J., Webel, R., Auerochs, S., Sticht, H., Marschall, M. (2010). Novel mode of phosphorylation-triggered reorganization of the nuclear lamina during nuclear egress of human cytomegalovirus. *Journal of Biological Chemistry* 285, 13979–13989.
- *Moens, U., Krumbholz, A., Ehlers, B., Zell, R., Johne, R., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C. (2017). Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infection, Genetics and Evolution* 54, 18–38.

- *Moir, R. D., Yoon, M., Khuon, S., Goldman, R. D.** (2000). Nuclear lamins A and B1: Different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *Journal of Cell Biology* 151, 1155–1168.
- Montross, L., Watkins, S., Moreland, R. B., Mamon, H., Caspar, D. L., Garcea, R. L.** (1991). Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *Journal of Virology* 65, 4991–4998.
- Moreland, R. B., Garcea, R. L.** (1991). Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185, 513–518.
- Moreland, R. B., Monstross, L., Garcea, R. L.** (1990). Characterization of the DNA binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 65, 1168–1176.
- Moriuchi, T., Kuroda, M., Kusumoto, F., Osumi, T., Hirose, F.** (2016). Lamin A reassembly at the end of mitosis is regulated by its SUMO-interacting motif. *Experimental Cell Research* 342, 83–94.
- Moriyama, T., Marquez, J. P., Wakatsuki, T., Sorokin, A.** (2007). Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial Cells. *Journal of Virology* 81, 8552–8562.
- Morris-Love, J., Gee, G. V., O'Hara, B. A., Assetta, B., Atkinson, A. L., Dugan, A. S., Haley, S. A., Atwooda, W. J.** (2019). JC Polyomavirus uses extracellular vesicles to infect target cells Jenna. *American Society for Microbiology* 10, 1–9.
- Mou, F., Forest, T., Baines, J. D.** (2007). US3 of Herpes Simplex Virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected Cells. *Journal of Virology* 81, 6459–6470.
- Nakanishi, A., Shum, D., Morioka, H., Otsuka, E., Kasamatsu, H.** (2002). Interaction of the VP3 nuclear localization signal with the importin $\alpha 2/\beta$ heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *Journal of Virology* 76, 9368–9377.
- Neu, U., Wang, J., Macejak, D., Garcea, R. L., Stehle, T.** (2011). Structures of the major capsid proteins of the human Karolinska Institutet and Washington University polyomaviruses. *Journal of Virology* 85, 7384–7392.
- Neu, Ursula, Allen, S. ann A., Blaum, B. S., Liu, Y., Frank, M., Palma, A. S., Ströh, L. J., Feizi, T., Peters, T., Atwood, W. J., Stehle, T.** (2013). A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathogens* 9.
- Nibert, M. L., Schiff, L. A., Fields, B. N.** (1991). Mammalian reoviruses contain a myristoylated structural protein. *Journal of Virology* 65, 1960–1967.
- Nicolson, S. C., Samulski, R. J.** (2014). Recombinant adeno-associated virus utilizes host cell nuclear import machinery to enter the nucleus. *Journal of Virology* 88, 4132–4144.
- Nigg, E. A., Kitten, G. T., Vorbuerger, K.** (1992). Targeting lamin proteins to the nuclear envelope: The role of CaaX box modifications. *Biochemical Society Transactions* 20, 500–504.
- Norkin, L. C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A., Oppenheim, A.** (2002). Caveolar endocytosis of Simian virus 40 is followed by brefeldin a-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *Journal of Virology* 76, 5156–5166.
- O'Hara, S. D., Stehle, T., Garcea, R.** (2014). Glycan receptors of the Polyomaviridae: Structure, function, and pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 7, 73–78.
- Okada, Y., Suzuki, T., Sunden, Y., Orba, Y., Kose, S., Imamoto, N., Takahashi, H., Tanaka, S., Hall, W. W., Nagashima, K., Sawa, H.** (2005). Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: Role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Reports* 6, 452–457.
- Padgett, B. L., Zurhein, G. M., Walker, D. L., Eckroade, R. J., Dessel, B. H.** (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1, 1257–1260.

- Palková, Z., Adamec, T., Liebl, D., Štokrová, J., Forstová, J.** (2000). Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interaction with cell structures. *FEBS Letters* 478, 281–289.
- Palková, Zdena, Španielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J., Amati, P.** (2000). The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS Letters* 467, 359–364.
- Panté, N., Kann, M.** (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of 39 nm. *Molecular Biology of the Cell* 13, 425–434.
- Pappas, G. D.** (1956). The fine structure of the nuclear envelope of *Endamoeba blattae*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2, 431–435.
- Pho, M. T., Ashok, A., Atwood, W. J.** (2000). JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Journal of Virology* 74, 2288–2292.
- Porwal, M., Cohen, S., Snoussi, K., Popa-Wagner, R., Anderson, F., Dugot-Senant, N., Wodrich, H., Dinsart, C., Kleinschmidt, J. A., Panté, N., Kann, M.** (2013). Parvoviruses cause nuclear envelope breakdown by activating key enzymes of mitosis. *PLoS Pathogens* 9.
- Qian, M., Cai, D., Verhey, K. J., Tsai, B.** (2009). A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathogens* 5.
- Rainey-Barger, E. K., Magnuson, B., Tsai, B.** (2007). A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Virology* 81, 12996–13004.
- Rainey-Barger, E. K., Mkrtchian, S., Tsai, B.** (2009). The C-terminal domain of ERp29 mediates polyomavirus binding, unfolding, and infection. *Journal of Virology* 83, 1483–1491.
- Rao, L., Perez, D., White, E.** (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 135, 1441–1455.
- *Ravindran, M. S., Bagchi, P., Cunningham, C. N., Tsai, B.** (2016). Opportunistic intruders: How viruses orchestrate ER functions to infect cells. *Nature Reviews Microbiology* 14, 407–420.
- Ravindran, M. S., Bagchi, P., Inoue, T., Tsai, B.** (2015). A non-enveloped virus hijacks host disaggregation machinery to translocate across the endoplasmic reticulum membrane. *PLoS Pathogens* 11, 1–28.
- Rayment, I., Baker, T. S., Caspar, D. L. D., Murakami, W. T.** (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295, 110–115.
- Reis-Sobreiro, M., Chen, J. F., Novitskaya, T., You, S., Morley, S., Steadman, K., Gill, N. K., Eskaros, A., Rotinen, M., Chu, C. Y., Chung, L. W. K., Tanaka, H., Yang, W., Knudsen, B. S., Tseng, H. R., Rowat, A. C., Posadas, E. M., Zijlstra, A., Vizio, D. Di, Freeman, M. R.** (2018). Emerin deregulation links nuclear shape instability to metastatic potential. *Cancer Research* 78, 6086–6097.
- Reynolds, A. E., Liang, L., Baines, J. D.** (2004). Conformational changes in the nuclear lamina induced by Herpes Simplex Virus type 1 require genes UL31 and UL34. *Journal of Virology* 78, 5564–5575.
- Reynolds, A. E., Ryckman, B. J., Baines, J. D., Zhou, Y., Liang, L., Roller, R. J.** (2001). UL31 and UL34 proteins of Herpes Simplex Virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *Journal of Virology* 75, 8803–8817.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Štokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J.** (2001). Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *Journal of Virology* 75, 10880–10891.
- Rober, R. A., Weber, K., Osborn, M.** (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: A developmental study. *Development* 105, 365–378.

- *Rusiñol, A. E., Sinensky, M. S.** (2006). Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *Journal of Cell Science* 119, 3265–3272.
- Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R., Benjamin, T.** (1993). Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* 192, 142–153.
- Salunke, D. M., Caspar, D. L. D., Garcea, R. L.** (1986). Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46, 895–904.
- Sanjuan, N., Porrás, A., Otero, J.** (2003). Microtubule-dependent intracellular transport of murine polyomavirus. *Virology* 313, 105–116.
- *Saribas, A. S., Coric, P., Hamzaspyan, A., Davis, W., Axman, R., White, M. K., Abou-Gharbia, M., Childers, W., Condra, J. H., Bouaziz, S., Safak, M.** (2016). Emerging from the unknown structural and functional features of agnoprotein of polyomaviruses. *Cell Physiology Journal* 231, 2115–2127.
- Saribas, A. S., Mun, S., Johnson, J., El-Hajmoussa, M., White, M. K., Safak, M.** (2015). Human polyoma JC virus minor capsid proteins, VP2 and VP3, enhance large T antigen binding to the origin of viral DNA replication: Evidence for their involvement in regulation of the viral DNA replication. *Virology* 449, 1–16.
- Sariyer, I. K., Saribas, A. S., White, M. K., Safak, M.** (2011). Infection by agnoprotein-negative mutants of polyomavirus JC and SV40 results in the release of virions that are mostly deficient in DNA content. *Virology Journal*, 8, 1–15.
- Schowalter, R. M., Buck, C. B.** (2013). The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein. *PLoS Pathogens* 9.
- Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Buck, C. B.** (2011). Glycosaminoglycans and sialylated glycans sequentially facilitate Merkel cell polyomavirus infectious entry. *PLoS Pathogens* 7.
- Shimia, T., Kittisopikul, M., Tran, J., Goldman, A. E., Adam, S. A., Zheng, Y., Jaqaman, K., Goldman, R. D.** (2015). Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Molecular Biology of the Cell* 26, 4075–4086.
- Siddell, S. G., Smith, A. E.** (1978). Polyoma virus has three late mRNA's: one for each virion protein. *Journal of Virology* 27, 427–431.
- Soeda, E., Arrand, J. R., Smolar, N., Walsh, J. E., Griffin, B. E.** (1980). Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* 283, 445–453.
- Soldatova, I., Prilepskaja, T., Abrahamyan, L., Forstová, J., Huérfano, S.** (2018). Interaction of the mouse polyomavirus capsid proteins with importins is required for efficient import of viral DNA into the cell nucleus. *Viruses* 10, 1–22.
- Solovei, I., Wang, A. S., Thanisch, K., Schmidt, C. S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T. V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., Herrmann, H., Blum, H., Engelkamp, D., Stewart, C. L., Leonhardt, H., Joffe, B.** (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell* 152, 584–598.
- Stehle, T., Harrison, S. C.** (1996). Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4, 183–194.
- Stick, R.** (1992). The gene structure of Xenopus nuclear lamin A: A model for the evolution of A-type from B-type lamins by exon shuffling. *Chromosoma* 101, 566–574.
- *Stiekema, M., van Zandvoort, M. A. M. J., Ramaekers, F. C. S., Broers, J. L. V.** (2020). Structural and mechanical aberrations of the nuclear lamina in disease. *Cells* 9.
- Strelkov, S. V., Schumacher, J., Burkhard, P., Aebi, U., Herrmann, H.** (2004). Crystal structure of the human lamin a coil 2B dimer: Implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *Journal of Molecular Biology* 343, 1067–1080.
- Streuli, C. H., Griffin, B. E.** (1987). Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326, 619–622.

- Ströh, L. J., Gee, G. V., Blaum, B. S., Dugan, A. S., Feltkamp, M. C. W., Atwood, W. J., Stehle, T.** (2015). Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus uses a displaced binding site on VP1 to engage sialylated glycolipids. *PLoS Pathogens* 11, 1–25.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L., Burke, B.** (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology* 147, 913–919.
- Suzuki, T., Orba, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Kimura, T., Tanaka, S., Nagashima, K., Hall, W. W., Sawa, H.** (2010). The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathogens* 6.
- Sweet, B. H., Hilleman, M. R.** (1960). The vacuolating virus, SV40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 105, 420–427.
- Sylvius, N., Hathaway, A., Boudreau, E., Gupta, P., Labib, S., Bolongo, P. M., Rippstein, P., McBride, H., Bilinska, Z. T., Tesson, F.** (2008). Specific contribution of lamin A and lamin C in the development of laminopathies. *Experimental Cell Research* 314, 2362–2375.
- Tsai, B., Gilbert, J. M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T. L., Rapoport, T. A.** (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO Journal* 22, 4346–4355.
- Turgay, Y., Medalia, O.** (2017). The structure of lamin filaments in somatic cells as revealed by cryo-electron tomography. *Nucleus* 8, 475–481.
- Turgay, Yagmur, Eibauer, M., Goldman, A. E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., Dubrovsky-Gaupp, A., Sapra, K. T., Goldman, R. D., Medalia, O.** (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature* 543, 261–264.
- Van Loosdregt, I. A. E. W., Kamps, M. A. F., Oomens, C. W. J., Loerakker, S., Broers, J. L. V., Bouten, C. V. C.** (2017). Lmna knockout mouse embryonic fibroblasts are less contractile than their wild-type counterparts. *Integrative Biology* 9, 709–721.
- Váňová, J., Hejtmánková, A., Žáčková Suchanová, J., Sauerová, P., Forstová, J., Hubálek Kalbáčová, M., Španielová, H.** (2020). Influence of cell-penetrating peptides on the activity and stability of virus-based nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 576.
- Walczak, C. P., Tsai, B.** (2011). A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *Journal of Virology* 85, 2386–2396.
- Walczak, Christopher Paul, Ravindran, M. S., Inoue, T., Tsai, B.** (2014). A cytosolic chaperone complexes with dynamic membrane J-Proteins and mobilizes a nonenveloped virus out of the endoplasmic reticulum. *PLoS Pathogens* 10.
- Weber, K., Plessmann, U., Traub, P.** (1989). Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Letters* 257, 411–414.
- White, M. K., Khalili, K.** (2006). Interaction of retinoblastoma protein family members with large T-antigen of primate polyomaviruses. *Oncogene* 25, 5286–5293.
- Yang, R. C. A., Wu, R.** (1979). BK virus DNA: Complete nucleotide sequence of a human tumor virus. *Science* 206, 456–462.
- Zhang, Y. Q., Sarge, K. D.** (2008). Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. *Journal of Cell Biology* 182, 35–39.
- Zhao, L., Marciano, A. T., Rivet, C. R., Imperiale, M. J.** (2016). Caveolin- and clathrin-independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells. *Virology* 492, 66–72.
- Zu Rhein, G. M., Chou, S. M.** (1965). Particles resembling papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science* 148, 1477–1479.

* review

Michal Mrkáček (2018): Studium interakcí hlavního strukturního proteinu polyomaviru se strukturami hostitelských buněk. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.

Alena Morávková (2001): Příprava protilátek proti hlavnímu strukturnímu proteinu myšího polyomaviru. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.

Alexandra Kozmanová: Príprava monoklonálnej protilátky proti hlavnému štruktúrnemu proteínu VP1 BK vírusu a konštrukcia plazmidov pre vyhľadávanie proteínovýchinterakcií metódou BiFC. Praha, 2011. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha.

Chavez-Calvillo, G. (2014). Structure, Assembly and Applications of Viral Coat Proteins. Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional La Proteína de la Cápside de los Virus: un acercamiento a su Estructura y Ensamblaje, Mexico city.